

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 9

De la morphologie et de la vitalité
du Colibacille
au cours de sa multiplication "in vitro"

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1938

PAR

Yvonne JUND

Pharmacien

JURY { MM. RADAIS, *Président.*
LAUNOY, *Professeur.*
RÉGNIER, *Maitre de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1938

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U. N° 9

De la morphologie et de la vitalité du Colibacille au cours de sa multiplication "in vitro"

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris (PHARMACIE)

présentée et soutenue le

1938

PAR

Yvonne JUND

Pharmacien

JURY { MM. RADAIS, *Président.*
LAUNOY, *Professeur.*
RÉGNIER, *Maître de Conférences.*

PARIS

JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1938

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I. Membre de l'Institut.
P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.	Botanique générale.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I, Membre de l'Institut.	Pharmacie chimique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HERISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
PICON, ☉ I.	Physique.
MASCRE, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I, et DÉLÉPINE, O. ✱, ☉ I, Membres de l'Institut.
GUERBET, ✱, ☉ I, PERROT, C. ✱, ☉ I., COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.,
BOUGAULT, O. ✱, ☉ I. et TASSILLY, O. ✱, ☉ I.

MAITRES DE CONFÉRENCES

MM. BACH, ☉ I.	Microbiologie.
FLEURY, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
BEDÉL, ☉ I.	Minéralogie, Législation et Déontologie pharmaceutiques.
REGNIER, ☉ I.	Parasitologie.
CHARONNAT, ☉ I.	Chimie et Pharmacie Chimique.
JANOT	Pharmacie galénique et biologie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1 ^{re} année.	Chimie générale et pharmaceutique.
GAUTIER, travaux pratiques de 2 ^e et 3 ^e année.	Chimie analytique.
PARIS.	Micrographie.
X.	Physique.
GUILLOT, travaux pratiques de 4 ^e année.	Chimie biologique, Bromatologie et Pharmacie chimique.
DEVAL, ✱, ☉ I.	Microbiologie.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☉ A.



A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Médecine

*Qui m'a fait l'honneur de présider le jury
de cette thèse, en témoignage de ma pro-
fonde et respectueuse gratitude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LAUNOY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris

*Qui a bien voulu accepter cette thèse et
me permettre de m'inscrire à son labora-
toire, en témoignage de ma respectueuse
reconnaissance et de ma profonde gratitude
pour son enseignement.*

A MONSIEUR J. RÉGNIER

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris

*A qui je dois le sujet de cette thèse et qui
n'a cessé de guider mon travail, en témoi-
gnage de ma très vive reconnaissance, de
mon entier dévouement et de mon attache-
ment respectueux.*

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I	
<i>Etude quantitative de la multiplication du Colibacille cultivé en bouillon de viande peptoné, salé</i>	13
A. — Rappel des données acquises sur l'évolution des cultures bactériennes <i>in vitro</i> , et des méthodes permettant d'en effectuer l'étude quantitative	14
1 ^o Phase de latence	15
2 ^o Phase de multiplication logarithmique	16
3 ^o Phase d'accélération négative	18
4 ^o Phase de maximum stationnaire	18
5 ^o Phase de déclin	19
B. — 1 ^o Des méthodes permettant d'évaluer la totalité des microbes (morts et vivants) contenus dans une culture	20
2 ^o Des méthodes permettant la détermination du nombre des seuls germes « résistants » ou « repiquables » ..	21
C. — Essais personnels	21
I. — Choix de l'espèce microbienne	21
II. — Milieux de culture	22
III. — Préparation du matériel	23
IV. — Procédés de numération	24
α) Numération de la totalité des germes (morts et vivants), contenus dans une culture, par la méthode de numération microscopique indirecte, ou comparative, de WRIGHT-FRIES ..	24
1 ^o Principe et Historique	24
2 ^o Description de la technique	25
β) Détermination du nombre des germes « repiquables » contenus dans une culture microbienne	28

1° Qu'entend-on par « germes résistants » ou « repiquables » ?.....	28
2° Principe et historique de la méthode d'ensemencement des germes sur plaques de gélose et de la méthode des dilutions.....	29
V. — Marche des essais effectués pour suivre la multiplication du <i>B. Coli</i> en bouillon de viande peptoné, salé; numération des germes totaux par la méthode WRIGHT-FRIES; numération simultanée des seuls germes « repiquables » par la méthode dite des « plaques de gélose »	32
VI. — Résultats des essais.....	41
a) Interprétation, à l'aide des courbes de multiplication, des résultats numériques concernant la numération microscopique indirecte de WRIGHT-FRIES	45
b) Interprétation des courbes de multiplication correspondant aux numérations, par la méthode des ensemencements sur plaques de gélose....	48
c) Comparaison des résultats obtenus par l'emploi des deux méthodes de numération.....	50

CHAPITRE II

<i>Etude des variations de la taille du Colibacille en fonction de l'âge de la culture.....</i>	53
A. — Rappel des principaux travaux concernant les variations de la forme chez les bactéries et conclusions des auteurs	53
I. — La variabilité chez les micro-organismes. Monophormisme. Variations temporaires. Variations spontanées. Pléomorphisme	54
II. — Réalisation de « cultures pures ».....	60
III. — Travaux antérieurs concernant les variations morphologiques des bactéries au cours de l'évolution d'une culture	63
B. — Essais personnels	78
Détail d'une expérience.....	81
a) Détermination du grossissement du microscope....	81
b) Ensemencement du milieu.....	84

c) Mesure de la grandeur des éléments microbiens dans la culture au moment de l'ensemencement, et détermination de la « grandeur moyenne » correspondant à cette période	82
d) Détermination des « grandeurs moyennes » correspondant aux autres périodes de l'évolution de la culture	83
e) Résultats numériques et observations relevées au cours des essais	84
f) Courbes traduisant les variations de longueur du Colibacille en fonction de l'âge de la culture	87
g) Interprétation des courbes traduisant les variations de taille du colibacille au cours de la multiplication bactérienne	90
h) Rapprochement de la courbe des variations de la taille du <i>B. Coli</i> avec la courbe de multiplication de ce germe	92
i) Formes longues du Colibacille	95

CHAPITRE III

Etude de la variation de la résistance des germes au cours du développement de la culture.

Essais personnels :

A. — Etude des variations du « Rapport de vitalité » au cours du développement de la culture. Observations. Courbes	99
B. — Etude de la résistance des germes, prélevés à différentes phases de la multiplication microbienne, à l'action antiseptique de l'Iode	110
I. — Choix de la méthode	110
II. — Exposé général de la technique servant à la détermination du « Pouvoir antibiotique » d'une substance antiseptique, et des modifications apportées à cette technique pour l'adopter à nos propres essais	112
1° Modification portant sur le nombre des germes	113
2° Modification portant sur la composition du milieu	114
3° Modification concernant le dénombrement des germes en expérience, au cours de l'essai	114

III. — Marche générale des essais.....	119
1° Choix de la substance antiseptique utilisée....	119
2° Matériel des expériences.....	120
3° Germes en expérience.....	120
4° Dispositif général d'un essai.....	121
IV. — Résultats numériques.....	127
V. — Interprétation des résultats.....	132
VI. — Rapprochement des courbes traduisant les variations de la résistance des germes à l'action antiseptique de l'Iode, en fonction de leur âge, et des courbes traduisant les variations du « Rapport de Vitalité » des germes au cours de leur développement	133
CONCLUSIONS	138
BIBLIOGRAPHIE	140

De la morphologie et de la vitalité du Colibacille au cours de sa multiplication "in vitro"

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années déjà, Monsieur J. RÉGNIER et ses collaborateurs ont abordé l'étude quantitative de la multiplication microbienne. Cette question présente, outre son intérêt théorique, une importance pratique évidente, puisque la notion de « quantité microbienne » intervient fortement dans les divers processus, biologiques ou pathogènes, qu'exercent les bactéries.

Mais, à côté de la notion de multiplication microbienne, c'est-à-dire de l'accroissement mais aussi de la destruction de la masse protoplasmique, il y a lieu d'envisager la question des variations survenues, au cours de cette multiplication, dans les qualités individuelles des germes ; soit qu'il s'agisse de modifications morphologiques visibles, soit qu'il s'agisse de variations de vitalité, par exemple de changements de résistance vis-à-vis des actions antimicrobiennes. C'est plus spécialement dans ce dernier sens que, sur les conseils de Monsieur J. RÉGNIER, nous avons entrepris nos recherches. Il est, en effet, facile de concevoir que, dans les phénomènes bactériens, la *qualité* de la masse n'est pas moins importante que sa *quantité*. En effet, à masses égales, des microbes en pleine vitalité doivent exercer des actions biologiques ou pathogènes beaucoup plus intenses que celles des germes vieillis, moins résistants aux influences extérieures, et doués d'une faculté de multiplication moins rapide.

Dans divers travaux effectués précédemment au Labo-

ratoire, où nous avons travaillé, certains points de ces problèmes avaient déjà été abordés ; c'est ainsi que R. DAVID avait pu fixer vers la sixième ou la huitième heure de la culture, la fin de la période de multiplication régulière des germes, et que Madame A. KAPLAN avait été amenée à étudier les variations de vitalité des germes en se basant sur leur faculté de reproduction après transport sur milieux solidifiés.

Pour nous, nous avons voulu, d'une part, vérifier, à la suite de divers auteurs, les variations de longueur et de forme d'une bactérie (colibacille), au cours du développement de sa culture, et, d'autre part, reprenant les essais effectués par Madame A. KAPLAN, avec le bacille pyocyanique, étudier les variations de résistance du Colibacille, vis-à-vis d'une substance antiseptique, suivant l'heure de la culture.

On trouvera donc dans ce travail :

Dans un premier chapitre : L'exposé des techniques et particulièrement des méthodes de numération que nous avons utilisées, puis l'étude quantitative de la multiplication du *B. Coli* cultivé en bouillon de viande peptoné salé.

Dans un deuxième chapitre : L'étude des variations de taille du Colibacille au cours de sa multiplication.

Dans un troisième chapitre : L'étude des variations de la résistance microbienne, mises en évidence :

1° par les variations du « Rapport de vitalité » des germes, c'est-à-dire par les variations du rapport :
$$\frac{\text{germes repiquables}}{\text{totalité des germes visibles}}$$
, aux différentes heures de la culture ;

2° par l'action directe d'une substance antiseptique, l'Iode, exercée sur des germes d'âges différents.

On trouvera enfin l'exposé de nos conclusions et les références bibliographiques.

Mais avant de commencer l'exposé de notre travail, nous n'aurions garde d'oublier tous ceux qui nous ont permis de l'entreprendre, de le poursuivre et de l'achever.

Nous remercions très vivement Monsieur le Professeur RADAIS, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris, Membre de l'Académie de Médecine, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, et nous le prions de trouver ici l'expression de notre profond respect.

Nous sommes particulièrement reconnaissante à Monsieur LAUNOY, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, d'avoir bien voulu accueillir cette thèse à son laboratoire ; nous le remercions de l'intérêt qu'il a bien voulu accorder à notre travail et nous lui exprimons toute notre gratitude pour son précieux enseignement.

Nous tenons à exprimer à Monsieur J. RÉGNIER, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris, une gratitude toute spéciale. C'est à lui que nous devons le sujet de ce travail et pendant les nombreuses années que nous avons passées au laboratoire de la Pharmacie de l'Hôpital Ambroise-Paré, nous avons constamment trouvé l'appui de son érudition et de sa grande bienveillance. Nous ne saurions trop le remercier des nombreuses preuves d'intérêt qu'il nous a témoignées et nous l'assurons, à notre tour, de notre sincère et profond attachement.

Nous sommes également très heureuse de pouvoir dire ici, à Mademoiselle S. LAMBIN, Docteur ès sciences, Assistante de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Paris, combien nous lui sommes reconnaissante de l'aide si efficace qu'elle nous a généreusement prodiguée au cours de notre travail, et nous lui renouvelons notre témoignage de respectueuse et bien vive sympathie.

Nous remercions enfin nos camarades J. LÉGER et A. QUEVAUVILLER, pour le concours amical qu'ils nous ont souvent apporté au cours de nos recherches.

CHAPITRE I

Etude quantitative de la multiplication du Colibacille cultivé en bouillon de viande peptoné, salé.

Un travail précédemment effectué par A. KAPLAN [32] sous la direction de M. J. RÉGNIER, portant sur la multiplication du bacille pyocyanique cultivé en bouillon de viande peptoné salé, avait amené l'auteur à constater que la proportion des germes « résistants » ou « repiquables » (1) par rapport à la totalité des germes de la culture, variait au cours de la multiplication. Ceci semblait indiquer une variation de l'état de *vitalité* des germes en expérience. En même temps que ces changements dans la *vitalité* des germes, l'auteur crut pouvoir signaler des variations concomitantes de leur *morphologie*. A la suite de A. KAPLAN, nous avons entrepris de compléter l'étude de ces divers points, et observé tout particulièrement :

1° Les variations de la forme, et plus spécialement de la *taille* des germes, au cours de leur développement.

2° Les variations concomitantes de la *vitalité* et de la *résistance* des germes.

3° A l'aide des résultats acquis par l'étude des deux points précédents, nous avons recherché s'il était possible d'établir, aux diverses périodes de la multiplication bactérienne, un rapport entre : la *résistance* des microbes, leur *taille* et leur *âge*.

(1) Voir note page 21.

* * *

A. — Rappel des données acquises sur l'évolution des cultures bactériennes *in vitro* et des méthodes permettant d'en effectuer l'étude quantitative.

La poursuite de notre but exige une connaissance préalable de la multiplication microbienne *in vitro*. Nous allons donc passer rapidement en revue les données acquises.

Les nombreux travaux des auteurs français et étrangers, relatifs à l'étude de la multiplication microbienne *in vitro* s'accordent à reconnaître les faits suivants :

« Des bactéries viables, placées dans un milieu de culture approprié, commencent à s'y diviser, après une période plus ou moins longue de repos ou *latence*. Cette division, d'abord lente, s'accélère jusqu'à atteindre une valeur maxima de poussée, puis se ralentit et finit par cesser. C'est alors que commence la période de déclin, dite *de mort*, des germes. »

Nous n'insisterons pas ici sur ces divers travaux, dont l'examen détaillé et complet a été effectué dans le travail de R. DAVID [16] et dans la thèse de A. KAPLAN.

Disons seulement que, d'une façon générale, tous les auteurs retrouvent au cours de la multiplication bactérienne :

- 1° une phase initiale stationnaire ou phase de *latence*.
- 2° une phase de *multiplication dite logarithmique*.
- 3° une phase d'*accélération négative* ou de *multiplication ralentie*.
- 4° une phase de *maximum stationnaire*.
- 5° une phase de *déclin*.

Avant d'aborder le détail de nos propres recherches et afin de rendre plus intelligible l'exposé des résultats obtenus, nous croyons cependant devoir rappeler brièvement les conclusions essentielles concernant chacune des phases énumérées ci-dessus :

1. Phase de latence.

Les auteurs ont appelé « phase de latence » la période comprise entre le moment d'ensemencement de la culture et le moment où la multiplication des germes commence à s'effectuer, avec une vitesse uniforme et rapide.

Cette phase doit son nom à une constatation, faite pour la première fois en 1895 par MAX MÜLLER [46]. Cet auteur expérimentait sur le *B. typhique*, cultivé en bouillon, et dénombrait les germes par numération des colonies développées après ensemencement sur plaques de gélose. La constatation ainsi faite, confirmée par la plupart des anciens auteurs, peut se résumer ainsi : *il ne se produit pas de multiplication appréciable du nombre des germes dans une culture pendant les premières heures qui suivent l'ensemencement*. Dans les conditions ordinaires d'ensemencement (bouillon nutritif ordinaire, souche de 24 heures, introduction de plusieurs millions de germes, incubation à 37° c.), la durée de cette période de non multiplication, dite « période de repos » ou « période de latence », varie de 2 à 3 heures ; autrement dit le nombre des microbes existant, de 2 à 3 heures après l'ensemencement, dans une culture, maintenue à la température d'incubation favorable, est sensiblement égal au nombre des microbes introduits dans le milieu. L'explication de ce phénomène, auquel les anciens auteurs ont accordé une importance considérable, a donné lieu de leur part à de nombreuses recherches et à toute une série d'hypothèses passées en revue dans la thèse de R. DAVID [16] et sur lesquelles nous ne reviendrons pas ici.

Rappelons toutefois que dès 1908, BARBER [3] cultivant le *B. Coli* en bouillon peptoné, en utilisant une technique spéciale et très précise lui permettant de suivre directement au microscope les colonies développées à partir d'une « cellule unique » ensemencée dans une « goutte pendante » de bouillon, ne *retrouva pas* la phase de latence, et cons-

tata au contraire une division *immédiate* de la bactérie unique ensemencée.

J. RÉGNIER et S. LAMBIN [57] au cours de leurs recherches effectuées en 1927 avec le *B. pyocyane*, notèrent, de même, *l'absence de toute période de latence* dans la multiplication bactérienne, lorsque celle-ci était suivie au moyen d'une méthode de numération microscopique permettant de dénombrer directement les germes dans la culture ensemencée.

Ces derniers travaux furent repris par A. KAPLAN [32], qui expérimentait également sur le *B. pyocyane* cultivé en bouillon nutritif peptoné salé. L'auteur dénombra les germes totaux dans la culture, à l'aide du procédé de numération microscopique indirecte de WRIGHT-FRIES, *confirma* les résultats précédemment obtenus par J. RÉGNIER et S. LAMBIN et arriva à la conclusion suivante :

« Lorsqu'on étudie la multiplication microbienne au moyen de la numération microscopique on constate que la *phase de latence n'existe pas*. D'emblée commence une multiplication rapide, sensiblement logarithmique. La phase de latence n'apparaît que lorsqu'on suit la multiplication microbienne à l'aide des méthodes indirectes donnant le nombre des microbes d'après le nombre des colonies développées sur bouillon gélosé. Ceci prouve simplement que les bactéries développées aussitôt après l'ensemencement n'ont pu le faire que lorsqu'elles étaient plongées dans un milieu favorable où les éléments nutritifs pouvaient leur parvenir facilement, mais qu'elles sont incapables de résister aux dommages causés par la transplantation et surtout incapables de se développer sur milieu solidifié où l'absorption des aliments est évidemment plus difficile. »

2. Phase de multiplication logarithmique, ou de multiplication géométrique, ou de poussée constante et maxima.

Pendant cette période la multiplication microbienne s'effectue à un rythme *rapide et constant*.

MÜLLER [46] (1895), BÜCHNER, LONGARD et RIEDLIN [10] (1887) furent les premiers à définir cette phase, en effectuant la mesure des « temps de génération » (le temps de génération est l'intervalle de temps nécessaire pour qu'il y ait, par bipartition, formation d'un nombre double de bactéries) ; son appellation est due au fait que les temps de génération ont, à cette période, une durée *constante* et relativement *très faible*, en sorte que le nombre des microbes de la culture se trouve croître en progression géométrique, pendant des intervalles de temps croissant en progression arithmétique, d'où les expressions « multiplication géométrique » si l'on considère la série des chiffres obtenus, ou « multiplication logarithmique », si l'on considère les logarithmes de ces nombres.

Des études faites jusqu'à présent il résulte que, dans la plupart des cas, la durée de la période logarithmique *ne dépasse pas 8 heures*. Toutefois différents facteurs (espèce microbienne, composition et PH du milieu de culture, grandeur de l'ensemencement, température d'incubation), exercent une influence sensible sur la durée du temps de génération et de la phase logarithmique, ainsi qu'il résulte des travaux de nombreux auteurs (HEHEWERTH [27] (1901), LANE CLAYTON [36] (1919), MISS CHICK [13] (1912) REED et REYNOLDS [56] (1916), GRAHAM SMITH [60] (1920), PENFOLD et NORRIS [51] (1912), COHEN et CLARK [14 bis] (1919), etc.).

Sans entrer dans le détail de ces divers travaux rappelons cependant que, en ce qui concerne *l'influence de la constitution du milieu de culture*, BARBER est le seul à ne pas retrouver une action sensible exercée par le milieu sur la multiplication des bactéries. Ce fait, comme l'a noté A. KAPLAN, peut s'expliquer par les conditions très particulières utilisées par cet auteur pour suivre l'évolution microbienne.

Quant à *l'influence du nombre des microbes ensemencés*, A. KAPLAN qui s'est consacrée tout particulièrement à l'étude des variations de ce facteur dans son travail sur le *B. pyocyaneus*, est amenée à conclure que « quel que soit le nombre des microbes ensemencés, la durée de la phase

logarithmique est sensiblement constante, mais diminue toutefois de longueur quand on atteint des ensemencements extrêmement grands ».

Enfin, en ce qui concerne l'*influence de la température d'incubation*, MÜLLER, BARBER et LANE CLAYPON, s'accordent à reconnaître que, dans la plupart des cas, le temps de génération est minimum à 37° c.

Quant à la durée de la *phase logarithmique*, elle est, d'après les travaux de LANE CLAYPON, MISS CHICK, REED et REYNOLDS, d'autant plus courte que la température est plus élevée.

Tous les travaux consacrés à la multiplication bactérienne, et plus particulièrement les recherches les plus récentes des auteurs, font ressortir l'intérêt exceptionnel de la phase logarithmique à laquelle correspond la période d'*activité maxima* de la culture. Nous nous bornons ici à signaler cette importance, sur laquelle nous aurons l'occasion d'insister à propos de nos essais personnels sur la vitalité et la morphologie du Colibacille.

3. Phase d'accélération négative ou de multiplication ralentie.

Pendant cette période le nombre des microbes continue à croître, mais les temps de génération deviennent de plus en plus longs, tendant à l'infini et préparant la phase suivante dite de « maximum stationnaire ».

D'après JENSEN [31] (1928) on constate l'apparition, vers la fin de la période logarithmique précédant cette phase, de certaines formes microbiennes (« ombres bactériennes »), qui seraient incapables de se multiplier, ce qui expliquerait le ralentissement dans la croissance des germes pendant la phase de « multiplication ralentie ».

4. Phase de maximum stationnaire.

Pendant cette phase, observée en général 24 à 30 heures après l'ensemencement, le nombre des germes se maintient

sensiblement constant. Cette période précède immédiatement la « phase de mort », pendant laquelle le nombre des bactéries décroît de plus en plus vite.

5. Phase de déclin.

Diverses hypothèses ont été proposées pour expliquer l'arrêt de la multiplication des germes d'une culture *in vitro*. Elles peuvent se classer en trois groupes principaux :

a) La multiplication cesse par suite de l'*épuisement des aliments* dans le milieu de culture.

Ce point de vue fut en particulier soutenu par HENRICI [28].

b) La multiplication cesse par suite de l'accumulation dans le milieu des produits de déchet du métabolisme microbien ou des substances toxiques sécrétées par les microbes.

(EIJKMAN [17] (1904), RAHN [55] (1906), CHESNEY [12] (1916), etc.)

c) La multiplication cesse par suite d'une *limitation de l'espace vital*, autrement dit lorsque la population microbienne atteint dans le milieu une concentration maxima correspondant à une densité limite de cette population (OSCAR BAIL [2] (1929).)

Nous n'insisterons pas ici sur les problèmes soulevés par ces différentes hypothèses. Notons seulement que, pour une espèce microbienne donnée, il semble que la question pourrait être résolue par des recherches comparatives, les unes effectuées dans les conditions habituelles et les autres à partir de cultures dans un milieu sans cesse renouvelé, et débarrassé, par filtration, des substances toxiques et des produits du métabolisme microbien. Des recherches, dans ce sens, sont poursuivies actuellement au laboratoire de J. RÉGNIER.

B. — Des méthodes permettant de suivre l'évolution de la multiplication microbienne *in vitro*.

Connaissant ces données générales sur le cours de la multiplication microbienne *in vitro*, il nous restait à choisir parmi les méthodes permettant de suivre le processus de cette multiplication, celles qui s'adaptent plus particulièrement à notre but.

Les diverses méthodes proposées pour suivre l'évolution quantitative d'une culture microbienne ont été décrites en détail par J. RÉGNIER et ses collaborateurs, et notamment passées en revue dans la thèse présentée par R. DAVID [16] (1931). Nous ne reviendrons donc pas ici sur leur étude et nous rappellerons simplement que ce sont :

1° *des méthodes permettant d'évaluer la totalité des microbes (morts et vivants) contenus dans une culture.* — Ces techniques sont basées soit sur la mesure du volume ou du poids des masses microbiennes, soit sur l'évaluation de l'opacité des cultures, soit sur la détermination de la quantité de colorant absorbable par les éléments microbiens, etc., etc...

Dans ce groupe entrent également les différents procédés de numération microscopique des germes :

numération microscopique *directe* (technique de KLEIN et technique utilisant des « chambres de numération ») ;

numération microscopique *indirecte* (procédé WRIGHT-FRIES).

Nous insisterons plus loin sur cette dernière technique, couramment utilisée par tous les élèves de M. J. RÉGNIER, et que nous avons à leur suite utilisée pour nos numérations des germes totaux. Nous laisserons de côté, au contraire, les premiers groupes de techniques cités, qui, s'ils conviennent au titrage des vaccins, n'offrent plus qu'une faible sécurité pour suivre pendant de nombreuses heures l'évolution d'une culture dans un milieu qui se modifie sans cesse (modifications physiques et physiologiques très poussées, formations de précipités, etc...).

2° *Des méthodes permettant la détermination du nombre des seuls germes « résistants » ou « repiquables » d'une culture.*

— Ces germes « résistants » ou « repiquables » (1), c'est-à-dire capables de se reproduire, après transport de la culture mère dans un milieu neuf, sont dénombrés soit d'après leur *activité biochimique* (mesure des quantités d'alcool, d'acide lactique produits, etc.), soit grâce à des *procédés de coloration spéciaux*, tels celui de HENRICI permettant une distinction morphologique des germes « morts » et « vivants », soit enfin par le procédé plus courant d'*ensemencement sur plaques de gélose*.

En raison des observations de nos prédécesseurs, c'est à cette dernière méthode que nous avons eu recours pour nos essais et nous l'exposerons en détail en décrivant la marche suivie pour nos expériences.

C. — Essais personnels.

I. — *Choix de l'espèce microbienne.*

Désirant étudier, en même temps que l'évolution de la totalité des germes d'une culture, les variations morphologiques concomitantes de ces germes, nous avons tenu compte des travaux effectués par les auteurs qui se sont plus spécialement consacrés à l'étude des variations de la forme chez les bactéries.

C'est ainsi qu'à la suite des observations faites, en particulier par HENRICI [28] et JENSEN [31], nous avons été amenée à choisir pour nos propres recherches, le Colibacille,

(1) Par ce terme on désigne, à la suite de M. le Professeur RADAIS, les microbes capables de résister au transport dans un milieu autre que celui où ils ont pris naissance, et de se développer, par exemple, sur un milieu solidifié, en y donnant des colonies visibles.

Ces microbes « résistants » ou « repiquables » correspondant aux germes que les auteurs étrangers appellent « vivants ».

Nous considérons que ce dernier terme est impropre, car si tous les microbes capables de se reproduire sur un nouveau milieu sont vivants, ils ne représentent pas *la totalité* des microbes vivants; en effet, une bonne partie de ceux-ci, capables de se multiplier dans le milieu où ils ont pris naissance, sont incapables de résister au transport sur gélose.

ce microbe possédant le double avantage d'être d'une taille suffisante pour faciliter les observations quantitatives, et de présenter des variations morphologiques particulièrement importantes.

La souche que nous avons utilisée pour effectuer nos essais était une souche de Colibacille type, provenant de la collection de la Faculté de Pharmacie. Elle a été conservée en gélatine nutritive et repiquée tous les dix jours sur gélose nutritive inclinée.

II. — *Milieux de culture.*

1. BOUILLON DE CULTURE.

Lesensemencements ont été faits en bouillon simple peptoné salé, ajusté à $pH = 7$, dont la composition était la suivante :

Viande de bœuf hachée et dégraissée...	500 gr.
Peptone de Witte.....	20 gr.
Chlorure de sodium.....	5 gr.
Eau distillée q. s. pour 1 litre de bouillon.	

Après une macération de 24 heures dans l'eau distillée, la viande était exprimée et le liquide porté à l'ébullition pendant quelques minutes, de façon à produire la coagulation des albumines. On ajoutait alors la peptone et le chlorure de sodium, en agitant pour favoriser leur dissolution, et lorsque celle-ci était complète, on filtrait sur filtre Chardin, préalablement ébouillanté, pour éliminer les matières grasses. Le coagulum était lavé avec la quantité d'eau distillée nécessaire pour compléter au volume initial de 1.000 cm³. Le bouillon simple ainsi obtenu était ajusté à $pH = 7$, par addition d'une quantité convenable de lessive de soude diluée (le pH étant mesuré par la méthode colorimétrique comparative utilisant l'échelle de CLARK et LUBS). Le milieu ajusté était porté à l'autoclave 15 minutes à 120°, ce qui entraînait la précipitation des phosphates, puis soumis à une seconde filtration à chaud, sur

filtre Chardin ébouillanté. Il était ensuite réparti en ballons de 250 cm³, contenant chacun 100 cm³ de bouillon et munis de quelques billes de verre destinées à favoriser l'agitation au moment de l'ensemencement. Ces ballons contenant le bouillon étaient bouchés et stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 115° c.

2. BOUILLON GÉLOSÉ NUTRITIF.

Pour les ensemencements sur milieu gélosé, effectués à partir des cultures en bouillon, nous avons préparé un milieu nutritif solidifié, par addition de gélose au bouillon simple précédent, en observant les règles suivantes :

30 grammes de gélose sèche étaient mis à macérer dans l'eau distillée, une heure environ, de façon à produire le gonflement de la gélose. La gélose, bien exprimée, était introduite dans 1.000 cm³ de bouillon simple. On chauffait quelques minutes à l'ébullition, pour permettre la dissolution de la gélose et on ajustait le milieu à $pH = 7$ par addition convenable de lessive de soude diluée. On portait à l'autoclave et on maintenait à 120° c. une heure environ. Le milieu était ensuite filtré sur filtre Chardin ébouillanté. Après filtration, le milieu était réparti en tubes de 10 cm³, et les tubes bouchés au coton étaient stérilisés à l'autoclave 20 minutes à 115°.

III. — *Préparation du matériel.*

Tout le matériel devant servir aux essais (ballons à dilution, pipettes, boîtes de Pétri, etc...) a été préparé et stérilisé avec soin avant chaque expérience. Nous avons coiffé l'extrémité de chaque pipette d'un papier destiné à éviter toute contamination au moment de l'ouverture des paquets. Les boîtes de Pétri, les pipettes, et d'une façon générale, toute la verrerie sèche, ont été stérilisées au four Pasteur, pendant 20 minutes à 170° c. Pour les dilutions, nous disposons de fioles d'Erlenmeyer et de ballons de capacités appropriées. Nous y introduisons 10 cm³, 50 cm³ ou

100 cm³ d'eau distillée et quelques billes de verre, puis nous stérilisons à l'autoclave pendant 15 minutes à 120° c.

IV. — *Procédés de numération.*

A la suite de nombreux travaux et des essais critiques poursuivis au laboratoire par J. RÉGNIER et ses collaborateurs, travaux ayant fait l'objet de plusieurs thèses ou communications sur lesquelles nous n'avons pas à revenir ici, nous avons été amenée à choisir deux sortes de méthodes pour suivre l'évolution microbienne :

- α) *pour la numération de la totalité des germes (morts et vivants) : nous avons utilisé la méthode de numération microscopique indirecte de WRIGHT-FRIES.*
- β) *pour la numération des germes « repiquables » : nous avons utilisé le procédé d'ensemencement sur plaques de gélose.*

Avant d'exposer en détail l'application de ces techniques à nos propres essais, nous rappellerons brièvement le principe et l'historique de chacune d'elles.

- α) *Numération de la totalité des germes (morts ou vivants) contenus dans une culture, par la méthode de numération microscopique indirecte, ou comparative, de Wright-Fries.*

1. PRINCIPE ET HISTORIQUE.

Cette méthode est appelée méthode de WRIGHT-FRIES, parce qu'elle fut utilisée pour la première fois par le bactériologiste anglais WRIGHT [67], pour le titrage des vaccins. et modifiée plus tard par FRIES [21].

Son principe est le suivant : on mélange intimement un volume connu de la suspension bactérienne à titrer et un volume, également déterminé, de sang humain. On étale la préparation sur lames, aussi uniformément que possible. Sachant que 1 mm³ de sang renferme un nombre d'hématies, relativement fixe, de 5 millions, il est facile de déduire,

d'après la fréquence relative des hématies et des microbes dans un certain nombre de champs microscopiques, le nombre des germes contenus dans un volume donné de la suspension microbienne. Toutefois, telle quelle, la méthode de WRIGHT comporte certaines causes d'erreur.

En effet, d'une part le nombre des hématies du sang varie dans des proportions assez fortes, suivant les individus, et, pour le même individu, suivant les heures de la journée.

D'autre part, l'emploi du sang nécessite de grandes précautions pour éviter la coagulation, et l'étalement est rendu extrêmement délicat par le fait que les globules sanguins se déposent très vite.

La modification de FRIES (1921), qui substitue aux hématies une émulsion de levures, préalablement titrée à l'hématimètre, pouvant, dans des conditions faciles à réaliser, se conserver intacte plusieurs jours, et se prêtant fort bien à un étalement régulier, fait du procédé WRIGHT-FRIES une méthode commode pour suivre l'évolution de la population microbienne.

Cette méthode présente en outre le grand avantage de ne pas exiger la numération *immédiate* des lames, et offre, par suite, la possibilité d'effectuer, au cours de la multiplication microbienne, des prélèvements très rapprochés. Elle permet de plus, au cours des numérations, d'observer, et même, comme nous le verrons plus loin, de *mesurer*, les variations concomitantes se produisant dans la morphologie des germes. Ce dernier point (nous l'avons signalé et nous aurons l'occasion d'y revenir) est une condition essentielle de la réalisation du but que nous poursuivons.

2^o DESCRIPTION DE LA TECHNIQUE.

Cette technique comporte les opérations suivantes :

- a) préparation d'une émulsion de levure de *titre connu*;
- b) préparation de l'émulsion microbienne à *titrer* ;
- c) titrage de l'émulsion microbienne.

a) *Préparation et titrage de l'émulsion de levure.* — L'é-

émulsion de levure est préparée à partir de la levure de boulanger, aussi fraîche que possible. On prélève, à l'intérieur de la masse de levure, un petit fragment de 1 gr. environ, qui est émulsionné, dans un mortier de verre, avec 60 cm³ d'eau distillée ajoutée par petites portions ; on décante au fur et à mesure dans une fiole d'Erlenmeyer de 250 cm³, contenant quelques billes de verre. Ces proportions permettent d'obtenir une émulsion contenant approximativement 250 à 300.000.000 de cellules de levure par cm³ d'émulsion, et qui se prête bien à la numération. L'émulsion ainsi préparée est additionnée d'une petite quantité de chloroforme (0,5 cm³ environ par 60 cm³ d'émulsion), destiné à arrêter le développement des cellules. Elle est conservée à la glacière.

Avant d'effectuer le prélèvement destiné au titrage de l'émulsion de levure on agite soigneusement cette dernière, pendant 3 minutes environ, de façon à dissocier les cellules et à les répartir uniformément dans la masse du liquide.

La présence de billes de verre au sein de l'émulsion favorise cette opération de brassage et permet une dissociation plus complète des paquets de cellules.

Pour la numération des cellules de levure dans cette émulsion on prélève 1 cm³ de l'émulsion convenablement agitée et on complète à 50 cm³ avec de l'eau distillée, dans un ballon jaugé. C'est à partir de cette dilution à 1/50^e qu'on effectue la numération hématimétrique.

On utilise pour ceci l'hématimètre de Malassez, dont chaque rectangle, divisé en 20 petits carrés, correspond à un volume de 1/100^e de mm³. Le nombre total des cellules de levure comptées dans 5 rectangles, pris au hasard, correspond, dans le cas d'une dilution à 1/50^e, au titre de l'émulsion, exprimé en millions par centimètre cube.

Soit par exemple le chiffre de 240 cellules-levure, contenues dans 5 rectangles, c'est-à-dire dans 5/100^e de mm³.

1 cm³ d'émulsion contient :

$$\frac{240}{5} \times 100 \times 1.000 \times 50 = 240.000.000 \text{ de cellules de levure.}$$

b) *Préparation de l'émulsion microbienne à titrer.* — On prélève, sur une culture microbienne en gélose inclinée, âgée de 24 heures et cultivée à 37° c., une ou deux anses de microbes, et, avec toutes les précautions d'asepsie habituelles, on les dilue soigneusement dans les 10 cm³ d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une émulsion bien homogène. Cette émulsion est ensuite agitée pendant quelques minutes, la présence de billes de verre au sein du liquide favorisant encore la répartition homogène des germes. Il ne reste plus qu'à la titrer, à l'aide de l'émulsion de levure.

c) *Titrage de l'émulsion microbienne.* — A l'aide d'une pipette stérile, on prélève 1 cm³ de l'émulsion microbienne à titrer, rendue homogène par agitation préalable. Le prélèvement microbien est agité, dans un tube de verre stérile muni de quelques billes de verre, avec une petite quantité (2 cm³ en général) de l'émulsion de levure, préalablement titrée et soigneusement homogénéisée par agitation.

Le mélange levures-bactéries étant homogénéisé à son tour on en prélève une petite quantité, à l'aide d'une pipette Pasteur, dont on a coupé la pointe à la lime, et on en dépose rapidement une goutte sur une série de 4 lames propres et bien dégraissées par séjour dans l'alcool ammoniacal. L'étalement est réalisé à l'aide d'une pipette Pasteur, effilée et fermée à une extrémité ; on opère avec le plus de soin possible, de façon à obtenir une bonne répartition des microbes et des levures sur chaque lame. Après dessiccation ces étalements sont fixés par quelques gouttes de mélange alcool-éther et colorés, pendant une dizaine de minutes, par une solution de *fuchsine de Ziehl*, diluée à 1/5. Le lavage, à l'eau distillée, est ensuite effectué avec de grandes précautions, en laissant couler, très lentement, sur l'extrémité supérieure des lames maintenues inclinées, un mince filet de liquide, de façon à éviter le plus possible l'entraînement des bactéries.

Les étalements étant ainsi préparés on peut procéder à la numération microscopique, d'une part des bactéries,

et d'autre part, des cellules de levure, contenues dans un certain nombre de champs. Nous avons compté en moyenne 150 champs, répartis sur 3 ou 4 lames, et parfois davantage, suivant la fréquence des éléments dans le champ microscopique. Le système optique utilisé pour ces numérations comprenait :

- un oculaire compensateur n° 6 ;
- un objectif à immersion 1/15.

Pour déterminer le titre de la suspension microbienne examinée, il suffit d'appliquer la formule :

$$n = \frac{\text{Vol. de l'émuls. lev.}}{\text{Vol. de l'émuls. bact.}} \times \frac{\text{Somme Bact.}}{\text{Somme Lev.}} \times K$$

(nombre de
bactéries par cm³
d'émulsion)

K étant le titre de l'émulsion de levure, exprimé en *millions* par cm³.

On a ainsi le nombre des germes *totaux* contenus dans 1 cm³ de l'émulsion microbienne.

Voyons maintenant la méthode que nous avons utilisée pour dénombrer dans une culture les seuls germes « repiquables », à l'exclusion de ceux qui sont incapables de se reproduire après transport sur un nouveau milieu de culture.

β) Détermination du nombre des germes « résistants » ou « repiquables » contenus dans une culture microbienne.

1. QU'ENTEND-ON PAR GERMES « RÉSISTANTS » OU « REPIQUABLES » ?

Comme nous l'avons déjà signalé au début de ce chapitre, la méthode de numération microscopique indirecte de WRIGHT-FRIES, qui effectue le dénombrement de germes préalablement tués par fixation, puis colorés, ne permet pas de « distinguer », dans la totalité des microbes comptés, ceux qui, effectivement, ont été tués par fixation, et par conséquent se trouvaient « vivants » dans

l'émulsion microbienne, et ceux qui étaient déjà « morts » au moment du prélèvement, mais dont les cadavres, non encore lysés, restaient colorables. C'est en ce sens que la technique WRIGHT-FRIES appartient à la catégorie des méthodes donnant la totalité des germes, morts et vivants, contenus dans une culture.

Cependant des procédés de coloration spéciaux, tels que celui préconisé par HENRICI [28], basé sur le fait d'une distinction des cellules mortes et des cellules vivantes par une technique de coloration au *Rouge Congo*, permettent de déceler directement dans la culture les « cadavres » des germes. Dans ce cas l'épithète de « vivants », souvent utilisée par les auteurs, aurait son sens le plus large et d'ailleurs le plus exact, puisqu'elle s'appliquerait effectivement à tous les microbes d'une culture qui ne sont pas des microbes « morts ». Malheureusement, ces méthodes sont délicates, et de plus, comme l'ont montré les recherches de divers auteurs, elles n'assurent pas des résultats d'une certitude absolue. Pour éviter toute confusion et nous conformer à la distinction déjà mentionnée par A. KAPLAN [32] (thèse Paris, 1931, note p. 15) nous abandonnerons ici le qualificatif trop général de « germes vivants », et nous ne parlerons que de la catégorie spéciale des germes « résistants » ou « repiquables », que nous pouvons reconnaître par le procédé que nous allons décrire ci-dessous ; les microbes « repiquables » étant les microbes d'une culture, capables de se reproduire dans les conditions particulières et bien définies de l'expérience.

2. PRINCIPE ET HISTORIQUE DE LA MÉTHODE D'ENSEMENCEMENT DES GERMES SUR PLAQUES DE GÉLOSE ET DE LA MÉTHODE DES DILUTIONS.

Le procédé utilisé pour la détermination du nombre des germes « repiquables » contenus dans une culture consiste à ensemençer sur un milieu nutritif solidifié, étalé en boîtes de Pétri, une quantité connue de la culture *convenablement diluée*. Les boîtes de Pétri ainsi ensemençées sont mainte-

nues pendant quelque temps à l'étuve à 37° c., et on admet que chaque colonie développée correspond à un germe existant dans la culture.

Le principe de cesensemencements fut découvert par KOCH en 1884. Cet auteur utilisait des milieux nutritifs solidifiés par la gélatine qu'il coulait sur des plaques de verre flambées, puis recouvrait d'une cloche de verre pour éviter les contaminations extérieures. Cette technique fut ensuite améliorée par l'emploi des boîtes de Pétri et la substitution de la gélose à la gélatine, cette dernière ayant l'inconvénient d'être liquéfiée par un grand nombre de microbes et de ne pas se prêter à une incubation à 37° c., température optima de développement pour la plupart des germes.

Quant à l'emploi des dilutions, préconisé pour la première fois en 1860 par PASTEUR, il fut l'objet de nombreuses études, en particulier celles de KLEBS [33] (1873), LISTER (1878) et MIQUEL [45] (1887). M. le Professeur RADAIS perfectionna la technique des précédents chercheurs et l'appliqua à la numération du Colibacille dans les eaux. En ce qui concerne les dilutions destinées à la numération des germes sur milieux *solides* les recherches furent surtout orientées dans le but d'éviter les trop grandes dilutions de la cultureensemencée. En effet, l'emploi des dilutions fortes présentait, au dire de nombreux auteurs (LANE CLAYPON, MISS CHICK, WRIGHT, GRAHAM SMITH, PROUST [54], LONGARD et RIEDLIN, NEISSER, etc.), deux inconvénients sérieux :

celui de raréfier le nombre des germes servant de base à la numération, et par suite d'augmenter le coefficient de l'erreur inhérente à chaque opération.

celui d'augmenter la difficulté d'obtenir une bonne répartition des éléments microbiens dans toute la masse du liquide diluant.

Deux groupes de procédés furent proposés pour éviter les grandes dilutions :

a) ensemencement de très petites quantités de la sus-

pension microbienne, non diluée, par l'utilisation de pipettes capillaires ou d'anses graduées ;

- b) numération microscopique d'un très grand nombre de colonies, favorisée par l'emploi de dispositifs spéciaux.

Nous ne reviendrons pas ici sur ces différents procédés, déjà passés en revue dans le travail présenté par A. KAPLAN, et dont on peut, d'autre part, trouver l'examen critique dans la communication faite par J. RÉGNIER et L. NEIPP dans le *Bulletin des Sciences pharmacologiques* [58] Nous nous contenterons donc de rappeler, qu'à la suite des nombreux essais comparatifs poursuivis en vue de déterminer la meilleure technique à suivre pour l'application de la méthode dite des « plaques de gélose » à la numération des germes « résistants » d'une culture, ces auteurs ont noté que, pour obtenir avec cette méthode des résultats satisfaisants, il convenait d'observer les règles suivantes :

1° Le prélèvement effectué à partir de la culture microbienne dont on veut dénombrer les germes « repiquables », doit être *suffisamment élevé* pour pouvoir être mesuré avec précision à la pipette (de l'ordre du cm^3).

2° En ce qui concerne la pratique des dilutions, la bonne répartition des éléments microbiens dans toute la masse du liquide diluant est assurée :

a) en choisissant pour les dilutions un liquide *fluide*. Ce liquide peut être l'eau physiologique ou plus simplement de l'eau distillée stérile, qui d'ailleurs se révèle moins nuisible que l'eau physiologique pour la vitalité des germes en expérience ;

b) en favorisant l'homogénéité de l'émulsion microbienne par la présence au sein du liquide de billes de verre destinées à effectuer pendant l'agitation une dissociation plus parfaite des amas microbiens ;

c) en transportant, pour chaque nouvelle dilution, un volume de liquide assez grand pour qu'il puisse être mesuré avec précision (1 cm^3 environ) ;

d) enfin, le nombre et le degré des dilutions à effectuer doivent être déterminés à l'aide d'essais préliminaires de façon à obtenir une dilution finale telle que le nombre des colonies développées sur les plaques de gélose soit *suffisamment grand pour diminuer la portée de l'erreur relative à chaque numération, mais reste facile à dénombrer sur les plaques, à l'œil nu, avec l'aide occasionnelle de la loupe*. En ce qui concerne le dénombrement des colonies du Colibacille, la solution est la plus satisfaisante, lorsque le nombre des colonies sur chaque plaque est compris entre 50 et 100.

Nous allons décrire maintenant la marche générale que nous avons suivie pour étudier la multiplication du Colibacille cultivé en bouillon de viande peptoné, salé. Au cours de cet exposé nous verrons comment nous avons appliqué la méthode précédente pour dénombrer les germes « repiquables » de nos cultures.

**V. — Marche des essais effectués
pour suivre la multiplication du Bacille Coli
en bouillon de viande peptoné salé :**

- *Numération des germes totaux par la méthode WRIGHT-FRIES.*
- *Numération simultanée des seuls germes « repiquables » par la méthode dite « des plaques de gélose ».*

Notre objectif étant d'étudier le processus de l'évolution du nombre des microbes en fonction d'une seule variante : *l'âge de la culture*, tous nos essais de numération ont été effectués dans les mêmes conditions expérimentales :

La souche microbienne choisie était, comme nous l'avons indiqué plus haut (voir p. 22), une souche de Colibacille type. Les germes servant de point de départ à chaque expérience étaient des microbes *âgés de 24 heures*, prélevés sur une culture en gélose nutritive inclinée, effectuée à la température d'incubation de 37° c.

L'ensemencement de ces germes était effectué dans 100 cm³ de bouillon simple peptoné, salé, à raison de 500.000 germes par centimètre cube du milieu. Les prélèvements destinés aux expériences de numération permettant de suivre dans la culture l'évolution du nombre des germes totaux et des germes « repiquables » étaient effectués après :

2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures, 24 heures, 30 heures et 48 heures d'incubation à l'étuve à 37° c.

Au début de chaque essai les heures choisies pour les diverses numérations étaient suffisamment rapprochées pour nous permettre de suivre l'augmentation rapide du nombre des germes pendant la période dite de « multiplication logarithmique ». Nous avons ensuite effectué des prélèvements à la 24^e et à la 30^e heure, qui correspondent au maximum de densité des germes dans la culture, puis à la 48^e heure qui marque le début de la « période de mort » pendant laquelle le chiffre de la population bactérienne va sans cesse en décroissant (1).

Nous allons décrire en détail une de ces expériences, puis nous exposerons l'ensemble des résultats numériques concernant l'évolution du nombre des bactéries en fonction de l'âge de la culture. Nous présenterons enfin les conclusions auxquelles ces résultats nous ont permis d'aboutir.

DÉTAIL D'UNE EXPÉRIENCE

(Expérience n° 8 ; voir tableau p. 44 et courbe p. 51.)

a) Préparation et titrage de l'émulsion microbienne.

Les germes servant de point de départ à cet essai étaient des microbes âgés de 24 heures, prélevés dans une culture

(1) Des numérations effectuées au delà de la 48^e heure auraient pu nous donner des résultats encore intéressants pour l'étude de l'évolution quantitative des bactéries en fonction de l'âge d'une culture ; mais notre but n'était pas de suivre l'évolution même du nombre des germes, mais de suivre cette évolution en fonction des variations de la forme des bactéries, aussi n'avons-nous généralement poursuivi le dénombrement des bactéries de la culture que pendant l'intervalle de temps où les phénomènes morphologiques de cette culture restaient nets et mesurables.

de Bacille Coli effectuée sur gélose nutritive inclinée à la température de 37° c.

Deux anses de microbes étaient émulsionnées, avec les précautions d'usage pour éviter toute contamination extérieure, à l'intérieur d'un petit flacon d'Erlenmeyer contenant 10 cm³ d'eau distillée stérile et quelques billes de verre destinées à favoriser le brassage de l'émulsion microbienne ainsi préparée.

L'émulsion de levure utilisée pour dénombrer les germes totaux pendant toute la durée de l'essai, et conservée à la glacière dans l'intervalle des prélèvements, était préparée et titrée selon la technique décrite précédemment. Le titre de cette émulsion était de 244.000.000 (244×10^6) de cellules de levure par centimètre cube d'émulsion.

Pour titrer l'émulsion microbienne destinée à l'ensemencement du bouillon on mélangeait : 0 cm³ 5 de cette émulsion avec 2 cm³ de l'émulsion de levure titrée.

La préparation, la fixation et la coloration des étalements bactériens sur les lames destinées à la numération microscopique du nombre des germes totaux, suivant la méthode WRIGHT-FRIES, ont été réalisées dans les conditions décrites ci-dessus. Le total des bactéries dénombrées sur 3 lames était de 765, celui des cellules de levure comptées dans les mêmes lames, était 2.748, l'application de la formule :

$$n = \frac{\text{vol. de l'émul. levure}}{\text{vol. de l'émul. bact.}} \times \frac{\text{Somme bact.}}{\text{Somme lev.}} \times K$$

nous donnait donc :

$$n = \frac{2}{0,5} \times \frac{765}{2.748} \times 244 \times 10^6 = 271.700.000 \text{ bactéries.}$$

C'est-à-dire que l'émulsion microbienne contenait 271 millions 700.000 germes par centimètre cube.

b) Ensemencement du bouillon.

Disposant d'une émulsion microbienne ainsi titrée, nous avons ensemencé 100 cm³ de bouillon simple peptoné salé, à raison de 500.000 germes par centimètre cube.

Puisque nous avons 271.700.000 germes dans 1 cm³ d'émulsion, pour introduire 500.000 × 100 germes dans le milieu, il nous fallait prélever :

$$\frac{1 \times (500.000 \times 100)}{271.700.000} = 0 \text{ cm}^3 18 \text{ d'émulsion microbienne.}$$

Pour la commodité des prélèvements, nous avons effectué, à partir de cette émulsion, une dilution à 1/10^e, à l'aide d'eau distillée stérile, et nous avons prélevé 1 cm³ 8 de cette dilution qui ont été introduits dans 100 cm³ de bouillon, en observant les conditions habituelles d'aseptie.

**c) Numération des germes « repiquables »
dans la culture, aussitôt après l'ensemencement
de 500.000 germes totaux par centimètre cube.**

Les taux des dilutions à faire subir à la culture bactérienne pour obtenir sur les plaques de gélose un nombre de colonies compris entre 50 et 100 ont été déterminés comme nous l'avons noté précédemment, au cours d'essais préliminaires. Ces essais nous ont permis également de fixer, pour chaque heure de prélèvement, les volumes respectifs de culture et d'émulsion de levure nécessaires pour obtenir une bonne numération microscopique des germes totaux.

En ce qui concerne le dénombrement des germes « repiquables » se trouvant dans le bouillon au moment de l'ensemencement, la dilution finale adoptée pour l'ensemencement des plaques de gélose était de 1/2.000^e. Pour l'atteindre, nous introduisons 0 cm³ 5 du bouillon homogénéisé par agitation, dans 10 cm³ d'eau distillée stérile, puis de nouveau 1 cm³ de cette première dilution dans 100 cm³ d'eau distillée stérile. Aussitôt après le prélèvement, le milieu de culture était porté à l'étuve à 37° c. C'est à partir de cette deuxième et dernière dilution que nous ensemencions, avec toutes les précautions d'usage, 3 tubes contenant chacun 5 cm³ environ de gélose nutritive stérile, préalablement liquéfiée au bain-marie et maintenue à la température de

45° c. (1) ; chacun de ces tubes recevait 1 cm³ de la dilution microbienne.

La gélose liquide ainsi ensemencée était coulée immédiatement dans les boîtes de Pétri stériles préparées à cet effet. Après quelques instants la solidification du milieu s'étant produite, les boîtes étaient portées à l'étuve à 37° c. et retournées pour que l'eau de condensation ne risque pas de souiller les colonies. Ces dernières étaient comptées après 72 heures de séjour à l'étuve, la surface des boîtes ayant été divisée en petits rectangles au crayon gras pour faciliter le dénombrement.

Les boîtes correspondant à la numération des germes « repiquables » existant dans la culture au moment de l'ensemencement ont donné, dans cette expérience, les chiffres suivants :

Boîte n° 1	53 colonies
— n° 2	62 —
— n° 3	65 —

soit une moyenne de 60 colonies par boîte, ce qui correspondait, la dilution étant de 1/2.000^e, à :

$60 \times 2.000 = 120.000$ germes « repiquables » par centimètre cube de la culture.

**d) Numération des germes totaux
et « repiquables » aux différentes heures du croît bactérien.
Prélèvement de la 2^e heure.**

La rareté relative des germes dans la culture pendant les premières heures qui suivent l'ensemencement nous a obligée à prélever des volumes de bouillon assez importants pour le dénombrement des germes par le procédé WRIGHT-FRIES. C'est ainsi que, à la 2^e heure, nous prélevions 10 cm³

(1) Rappelons que cette température de 45° C. est la température optima qui permet une bonne répartition des éléments microbiens dans le milieu gélosé encore fluide, sans toutefois être assez élevée pour provoquer la mort des germes.

de bouillon préalablement agité. Cette prise d'essai était mélangée avec 0 cm³ 5 de l'émulsion de levure titrée et nous préparions les étalements sur lames, destinés à la numération microscopique des germes totaux en observant les détails techniques habituels.

En même temps nous faisons dans le milieu de culture un second prélèvement de 1 cm³ destiné à la préparation des dilutions nécessaires à l'ensemencement du milieu gélosé. La culture ayant été replacée à l'étuve à 37° c., nous procédions immédiatement aux opérations des dilutions et de la coulée des plaques de gélose, suivant la technique décrite plus haut.

Le taux de la dilution, à la 2^e heure, était de 1/2.500^e, obtenu en effectuant successivement deux dilutions de 1/50^e. Le dénombrement des germes totaux, par le procédé WRIGHT-FRIES, nous a donné les chiffres suivants :

Total des bactéries dénombrées sur 3 lames :	34
— levures — —	174

Ce qui correspondait à :

$$n = 10^6 \times \frac{0,5}{10} \times \frac{34}{174} \times 244 = 2.380.000 \text{ germes totaux par centimètre cube.}$$

Le nombre des colonies développées sur gélose était :

Boîte n° 1	80 colonies
— n° 2	85 —
— n° 3	84 —

soit une moyenne de 83 colonies par boîte. La dilution étant de 1/2.500^e nous avons donc : $83 \times 2.500 = 207.500$ germes « repiquables » par centimètre cube.

PRÉLÈVEMENT DE LA 4^e HEURE.

Numération des germes totaux :

Volume de la culture	10 cm ³
Volume de l'émulsion de levure.....	0 cm ³ 5

Nombre total des bactéries comptées sur 3 lames 569

Nombre total des cellules levure comptées sur 3 lames 244

soit $10^6 \times \frac{0,5}{10} \times \frac{569}{244} \times 244 = 28.450.000$ de germes totaux
par centimètre cube.

Numération des germes « repiquables » :

1 dilution à 1/10^e
1 — 1/50^e
— 1/100^e

soit une dilution finale de 1/50.000^e.

Le nombre des colonies dénombrées était :

Boîte n° 1	60 colonies
— n° 2	68 —
— n° 3	67 —
Moyenne.....	65 —

ce qui correspondait à : 3.250.000 germes repiquables par centimètre cube.

PRÉLÈVEMENT DE LA 6^e HEURE :

Numération des germes totaux :

Volume de la culture	2 cm ³
Volume de l'émulsion de levure.....	0 cm ³ 5
Nombre total des bactéries comptées sur 3 lames	4.453
Nombre total des cellules de levure comptées sur 3 lames.....	311

soit : $10^6 \times \frac{0,5}{2} \times \frac{4.453}{311} \times 244 = 873.410.000$ germes totaux
par centimètre cube.

Numération des germes repiquables :

1 dilution à	1/10 ^e
— —	1/20 ^e
— —	1/100 ^e

soit une dilution finale de 1/2.000.000^e.

Nous avonsensemencé 2 boîtes seulement.

Le nombre des colonies dénombrées était :

Boîte n° 1	92 colonies
— n° 2	95 —
Moyenne.....	93,5 —

ce qui correspondait à 187.000.000 *germes repiquables par centimètre cube*.

PRÉLÈVEMENT DE LA 8^e HEURE.

Numération des germes totaux :

Volume de la culture	1 cm ³
Volume de l'émulsion de levure.....	0 cm ³ 5
Nombre total des bactéries comptées sur 3 lames	2.915
Nombre total des cellules levure comptées sur 3 lames.....	247

soit $10^6 \times \frac{0,5}{1} \times \frac{2.915}{247} \times 244 = 1.439.700.000$ *germes totaux par centimètre cube*.

Numération des germes « repiquables » :

1 dilution à	1/10 ^e
3 —	1/100 ^e

soit une dilution finale de 1/10.000.000^e.

Le nombre des colonies dénombrées était :

Boîte n° 1	86 colonies
— n° 2	102 —
— n° 3	94 —
Moyenne	94 —

Ce qui correspondait à 940.000.000 *germes « repiquables »* par centimètre cube.

PRÉLÈVEMENT DE LA 24^e HEURE.

Les essais préliminaires nous avaient montré qu'à partir de cette période le bouillon de culture, très chargé en germes, devait être dilué pour se prêter à la numération microscopique des germes totaux. Nous prélevions donc 1 cm³ du milieu de culture et nous le déluions dans 10 cm³ d'eau distillée stérile; 1 cm³ de cette dilution servait à la préparation du mélange microbes-levures. Ce mélange était effectué en prenant des volumes égaux de la dilution microbienne et de l'émulsion de levure. Nous avons donc :

Numération des germes totaux :

Volume de la culture diluée à 1/10 ^e	1 cm ³
Volume de l'émulsion de levure.....	1 cm ³
Nombre des bactéries comptées sur 3 lames..	993
Nombre des cellules levure comptées sur 3 lames.....	1.282

soit $10^6 \times 10 \times \frac{993}{1.282} \times 244 = 1.889.900.000$ *germes totaux*
par centimètre cube.

Numération des germes « repiquables » :

1 dilution à	1/20 ^e
3 —	1/100 ^e

soit une dilution finale de 1/20.000.000^e

Le nombre des colonies dénombrées était :

Boîte n° 1	55 colonies
— n° 2	48 —
— n° 3	50 —
Moyenne	51 —

ce qui correspondait à : 1.020.000.000 *germes « repiquables »* par centimètre cube.

PRÉLÈVEMENT DE LA 30^e HEURE.

Conditions expérimentales exactement semblables à celles du prélèvement de la 24^e heure.

Nombre de bactéries comptées sur 3 lames..... 1.013

Nombre de cellules de levure comptées sur 3 lames. 914

soit $10^6 \times 10 \times \frac{1.013}{914} \times 244 = 2.704.200.000$ germes to-

taux par centimètre cube.

Nombre des colonies développées (2 boîtes seulement) :

Boîte n° 1 69 colonies

— n° 2 66 —

Moyenne 67,5 —

soit : 1.350.000.000 germes « repiquables » par centimètre cube.

Nous donnerons plus loin les résultats numériques de toutes nos expériences, faites aux différentes heures, expériences de numération des germes totaux et des germes « repiquables » contenus dans 100 cm³ de bouillon simple, ensemencé à raison de 500.000 germes par centimètre cube et incubé à 37° c. Tous ces essais ayant été conduits exactement comme nous venons de le décrire pour l'essai n° 8, nous ne reprendrons pas l'exposé détaillé de chacun d'eux et nous nous bornerons à indiquer les observations générales faites au cours de ces diverses expériences, ainsi que les conclusions que nous avons cru pouvoir en tirer.

VI. — Résultats des essais.

Deux heures après l'ensemencement, le bouillon nutritif incubé à 37° c. présente un trouble léger, mais nettement perceptible. Ce trouble s'accroît de plus en plus dans les heures qui suivent, et, à la 8^e heure, nous avons une culture épaisse avec dépôt. Pendant cette première période l'étalement sur lames s'effectue très facilement.

A la 24^e heure, la culture est extrêmement trouble et le dépôt est devenu très important. L'étalement du bouillon, qui doit alors être dilué en raison du grand nombre des germes qu'il contient, se fait difficilement.

A la 30^e heure, l'aspect est à peu près le même que précédemment, mais l'étalement est moins pénible, et à la 48^e heure, la culture, toujours très trouble, s'étale de nouveau facilement.

Notons que le dépôt, à tous les moments de la poussée, est toujours dissocié très facilement par agitation.

Voici les résultats numériques obtenus au cours de nos expériences :

RÉSULTATS NUMÉRIQUES

EXPÉRIENCE 1. — *Microbes visibles.*

(numération microscopique indirecte WRIGHT-FRIES).

Heures	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69
4	16,580	7,22
6	230,300	8,36
24	2.317	9,36
30	2.892	9,46
48	2.863	9,45

EXPÉRIENCE 2. — *Microbes visibles.*

Heures	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69
2	1,17	6,06
4	17,40	7,24
6	173,11	8,23
8	515,47	8,71
24	5.005	9,70
30	4.901	9,69
48	3.680	9,56

EXPÉRIENCE 3. — *Microbes visibles.*

Heures	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69
2	1,35	6,13
4	16,55	7,21
6	305,10	8,28
8	392,75	8,59
24	3.575,80	9,55
30	3.526,50	9,54

EXPÉRIENCE 4.

Heures	<i>Microbes visibles</i>		<i>Microbes « repiquables » sur gélose. (ou capables de se reproduire sur gélose)</i>	
	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69	0,170	5,23
2	1,030	6,01	0,140	5,14
4	6,950	6,84	3,500	6,54
6	231,410	8,36	120	8,07
8	405	8,60	401,500	8,60
24	8.553,100	9,93	2.100	9,32
30	6.016,500	9,77	3.650	9,56
48	5.724,900	9,60	2.200	9,34

EXPÉRIENCE 5.

Heures	<i>Microbes visibles.</i>		<i>Microbes « repiquables » sur gélose (ou capables de se reproduire sur gélose)</i>	
	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69	0,365	5,56
2	1,760	6,24	0,240	5,38
4	29,640	7,47	4,700	6,67
6	283,700	8,45	120	8,07
8	1.010	9	885	8,94
24	8.585,200	9,93	2.550	9,40
30	7.357,300	9,86	1.150	9,06
48	5.222,600	9,70	1.600	9,20

EXPÉRIENCE 6.

Heures	<i>Microbes visibles</i>		<i>Microbes capables de se reproduire sur gélose</i>	
	Nombres de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombres de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69		
2	1,370	6,13	0,215	5,33
4	29,980	7,47	0,950	5,98
6	300,820	8,47	35	7,54
8	822,660	8,91	285	8,45
24	3.048,500	9,48	1.850	9,26
30	4.332,700	9,62	2.600	9,41
48	3.432,300	9,53	2.600	9,41

EXPÉRIENCE 7.

Heures	<i>Microbes visibles</i>		<i>Microbes capables de se reproduire sur gélose</i>	
	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69	0,125	5,09
2	1,310	6,11	0,135	5,13
4	15,770	7,19	4,3725	6,64
6	226,560	8,35	102,500	8,01
8	419,880	8,62	280,500	8,44
24	2.004,700	9,30	715	8,85
30	1.680	9,22	467	8,66

EXPÉRIENCE 8.

Heures	<i>Microbes visibles</i>		<i>Microbes « repiquables » (ou capables de se reproduire sur gélose)</i>	
	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69	0,120	5,07
2	2,380	6,37	0,2075	5,30
4	28,450	7,45	3,250	6,51
6	873,410	8,94	187	8,27
8	1.439,700	9,15	940	8,97
24	1.889,900	9,27	1.020	9,00
30	2.704,200	9,43	1.350	9,13

EXPÉRIENCE 9.

Heures	<i>Microbes visibles</i>		<i>Microbes « repiquables »</i>	
	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes	Nombre de microbes par cm ³ (en millions)	Logarithmes des nombres de microbes
0	0,500	5,69	0,125	5,09
2	1,960	6,29	0,105	5,02
4	61,110	7,78	1,575	6,19
6	1.110,700	9,04	306	8,48
8	1.865,260	9,46	810	8,90
24	3.599,500	9,55	960	8,98
30	2.885,600	9,46	880	8,94

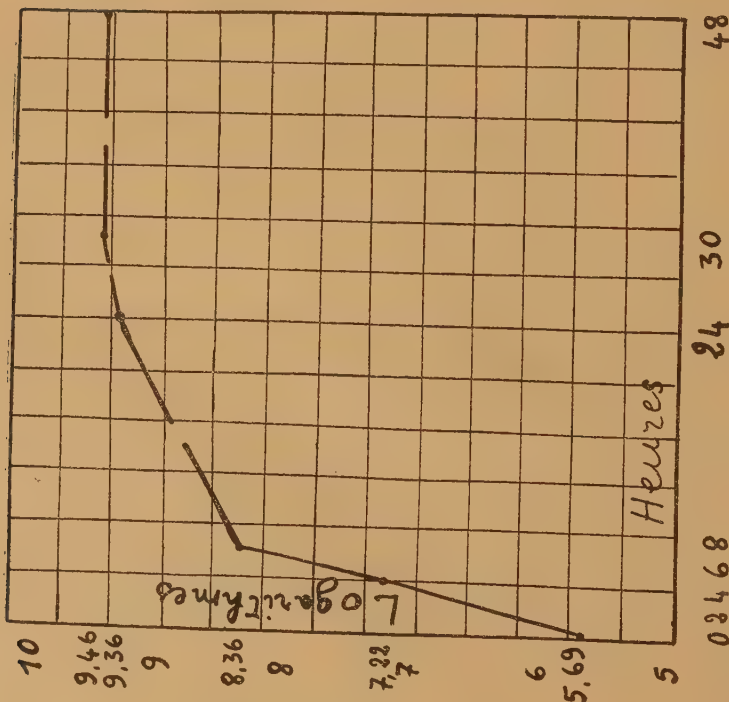
a) Interprétation, à l'aide des courbes de multiplication, des résultats numériques concernant la numération microscopique indirecte par la méthode Wright-Fries.

A l'aide des résultats fournis par nos deux méthodes de numération nous permettant de connaître le nombre des germes totaux et celui des germes « repiquables » contenus dans la culture à un âge déterminé, nous avons établi les « courbes de multiplication » correspondantes. Ces courbes, reproduites pages 46 et suivantes, ont été obtenues en portant en abscisses les heures auxquelles les prélèvements ont été effectués, et en ordonnée les logarithmes des nombres de microbes trouvés à chacun de ces moments dans 1 cm³ de la culture.

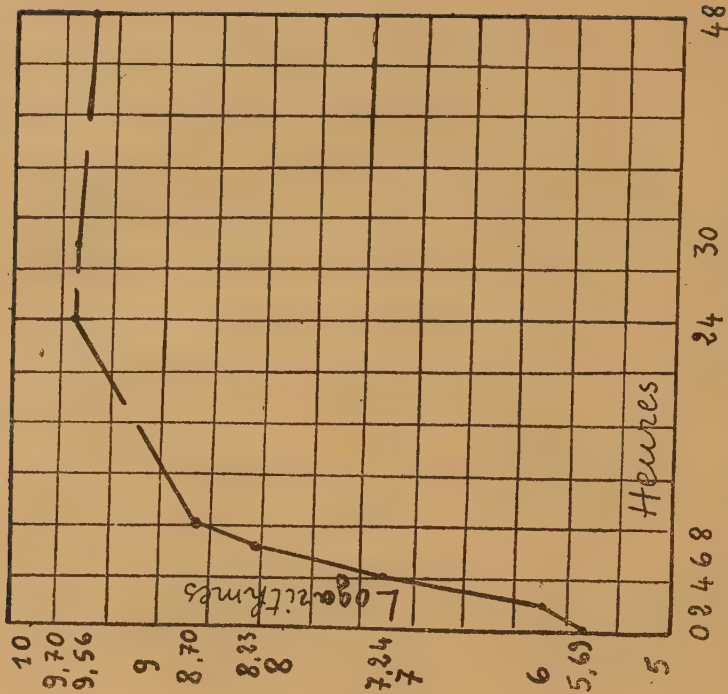
En ce qui concerne l'évolution de tous les germes visibles dénombrés par le procédé WRIGHT-FRIES l'examen de ces courbes permet, en accord avec les travaux antérieurs, de constater l'existence des phases suivantes :

Une phase de *multiplication logarithmique* (qui débute dès l'ensemencement) et qui se prolonge jusqu'à la 6^e heure ou 8^e heure.

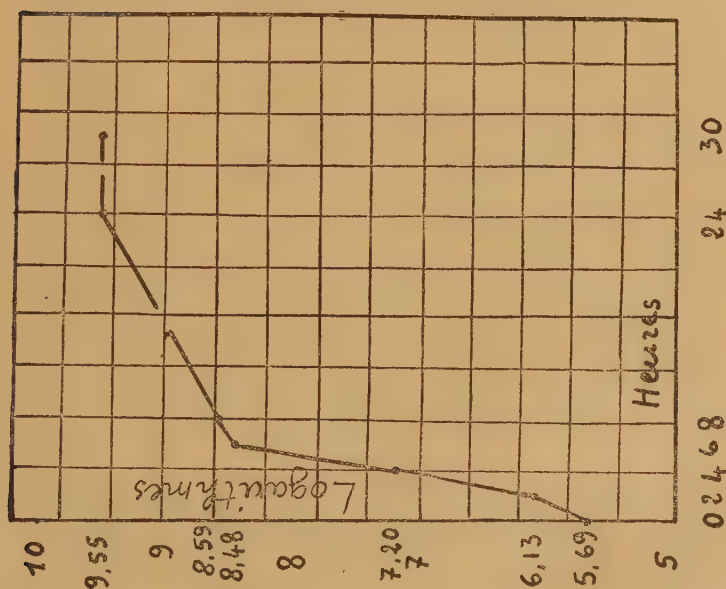
Une phase de *multiplication ralentie*, se poursuivant jusqu'à la 24^e heure (essais nos 2, 3, 4, 5, 7, 9) ou jusqu'à la



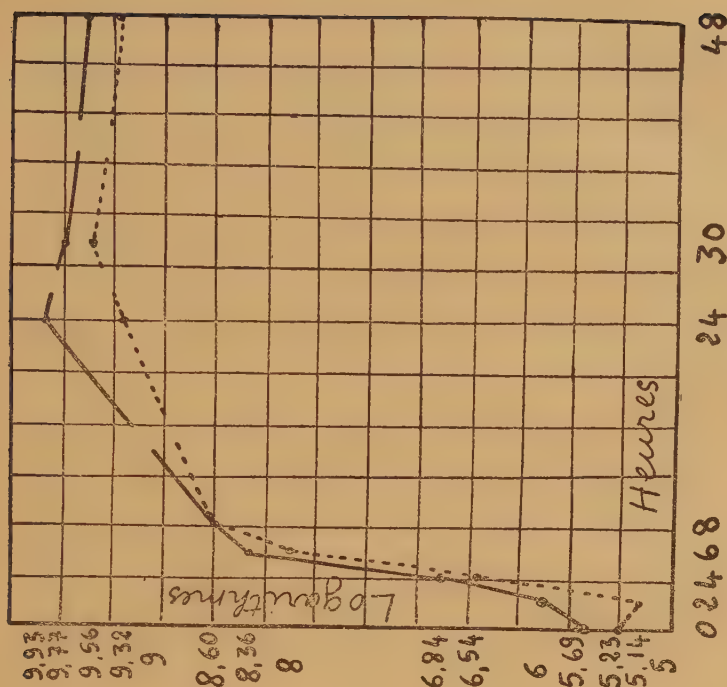
EXPÉRIENCE 1. — *Microbes visibles* (numération WRIGHT-FRIES).
Ensemencement : 500,000 germes par cm³.



EXPÉRIENCE 2. — *Microbes visibles* (numération WRIGHT-FRIES).
Ensemencement : 500,000 germes par cm³.



EXPÉRIENCE 3. — *Microbes visibles* (numération WRIGHT-FRIES).
Ensemencement : 500.000 germes par cm^3 .



EXPÉRIENCE 4. — *Microbes visibles* (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
Ensemencement : 500.000 germes par cm^3 .

30^e heure (essais n^{os} 1, 6, 8) les valeurs observées à ces deux périodes étant d'ailleurs très voisines.

Une phase de *maximum stationnaire*, que suit une *phase de déclin* ou *période de mort* des germes, toujours commencée à la 48^e heure de l'ensemencement.

Comme nous l'avons déjà noté, nous n'avons pas cherché à poursuivre l'étude de la multiplication microbienne au delà du terme qui nous était assigné par l'étude des variations concomitantes de la morphologie et de la résistance des germes.

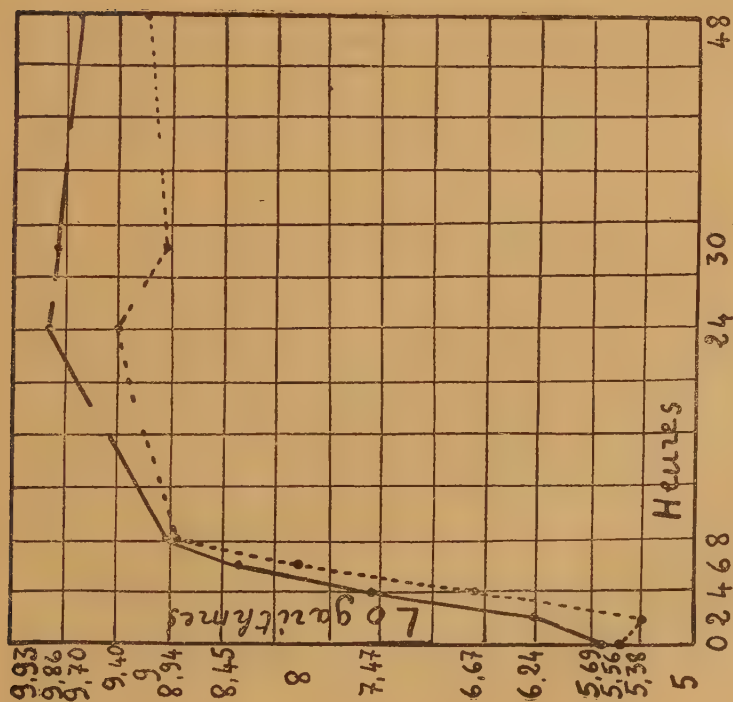
Ce terme était marqué par le début de la « période de mort », c'est-à-dire dans la plupart des cas par la 48^e heure de la culture. En effet, à partir du 3^e jour, et quelquefois dès la 48^e heure, la numération microscopique s'est révélée *très incertaine*, le colibacille présentait alors des formes mal définies, prenant mal le colorant, formes tellement différentes de l'aspect habituel de ce microbe qu'il devenait impossible de les identifier avec sûreté.

**b) Interprétation des courbes de multiplication
correspondant aux numérations
par la méthode des ensemencements sur plaques de gélose.**

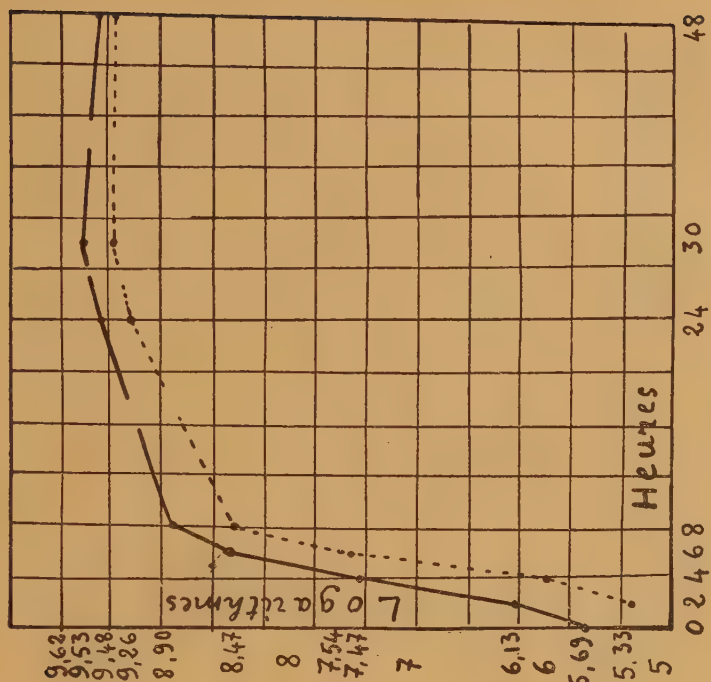
Les courbes de multiplication traduisant les variations du nombre des germes « repiquables » de la culture, en fonction du temps, ont été établies d'après les chiffres donnés par les ensemencements sur plaques, en suivant les règles déjà données. Les chiffres portés en abscisses représentent donc les heures des prélèvements et les chiffres des ordonnées correspondent aux logarithmes des nombres des germes « repiquables » contenus dans 1 cm³ de la culture.

Les courbes se rapportant à chacun des deux procédés de numération ont une allure générale très comparable. On

(1) Notons que ces résultats diffèrent légèrement de ceux obtenus par A. KAPLAN sur le B. Pyocyane, et dans lesquels la phase de multiplication ralentie se poursuivait jusqu'à la 48^e heure pour les numérations de la totalité des germes visibles, et jusqu'à la 30^e heure pour l'examen des microbes « résistants » ou « repiquables ».



EXPÉRIENCE 5. — Microbes visibles (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
Ensemencement : 500.000 germes par cm³.



EXPÉRIENCE 6. — Microbes visibles (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
Ensemencement : 500.000 germes par cm³.

peut constater en effet sur les unes et sur les autres, une même croissance rapide du nombre des éléments microbiens entre la 2^e et la 8^e heure (phase logarithmique), puis un ralentissement s'accroissant jusqu'à aboutir à une sorte de palier entre la 24^e et la 30^e heure (maximum stationnaire) et enfin une période nette de déclin.

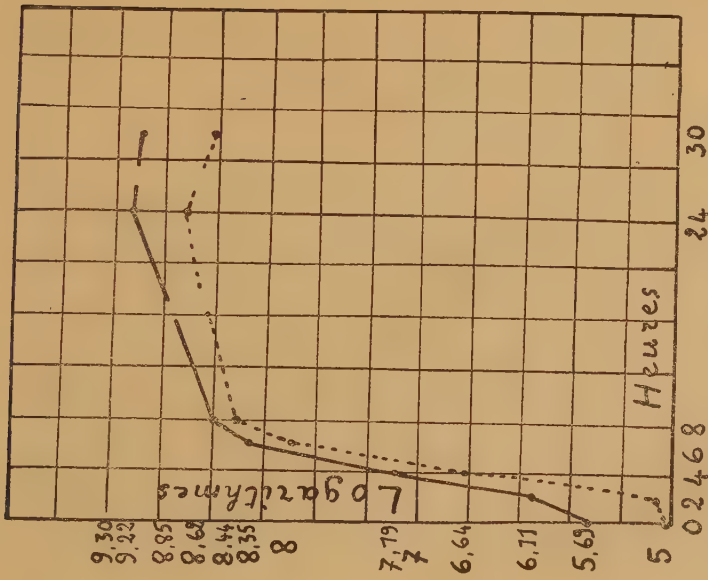
Toutefois, les courbes traduisant les variations du nombre des germes « repiquables », montrent une particularité, toujours retrouvée, et qui concerne la période des deux premières heures suivant l'ensemencement du bouillon.

En effet, tandis que la numération microscopique indirecte accuse un accroissement *immédiat* du nombre des germes dans la culture, et montre donc l'absence de « période de latence », au début de la poussée, la numération sur gélose montre à ce moment *un palier, voire une légère diminution de la quantité des germes* « repiquables » entre l'heure 0 (ensemencement) et la 2^e heure.

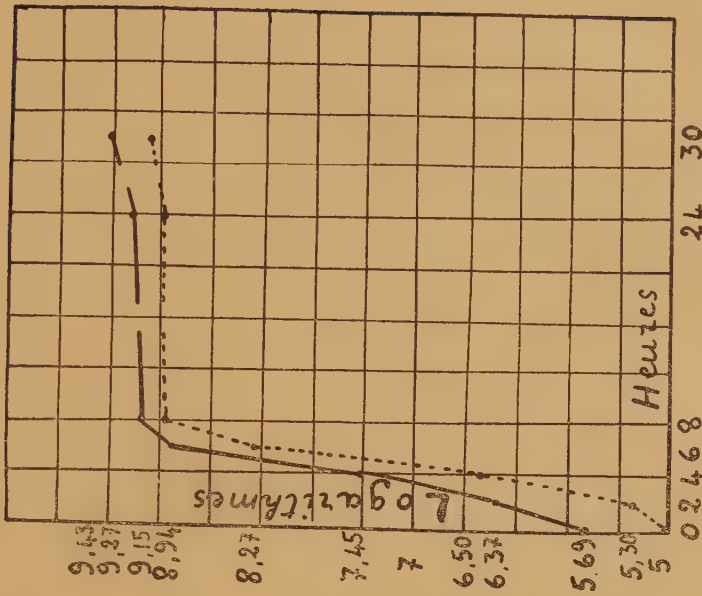
Ceci nous confirme dans l'opinion, déjà émise par J. RÉGNIER et S. LAMBIN [57] et par A. KAPLAN [32] qu'il se produit bien une multiplication microbienne pendant la « phase de latence », mais que les bactéries formées pendant cette période ne sont pas suffisamment résistantes pour supporter un transport dans un milieu nutritif neuf, solidifié, dont les principes nutritifs sont moins facilement absorbables.

c) Comparaison des résultats obtenus par l'emploi des deux méthodes de numération.

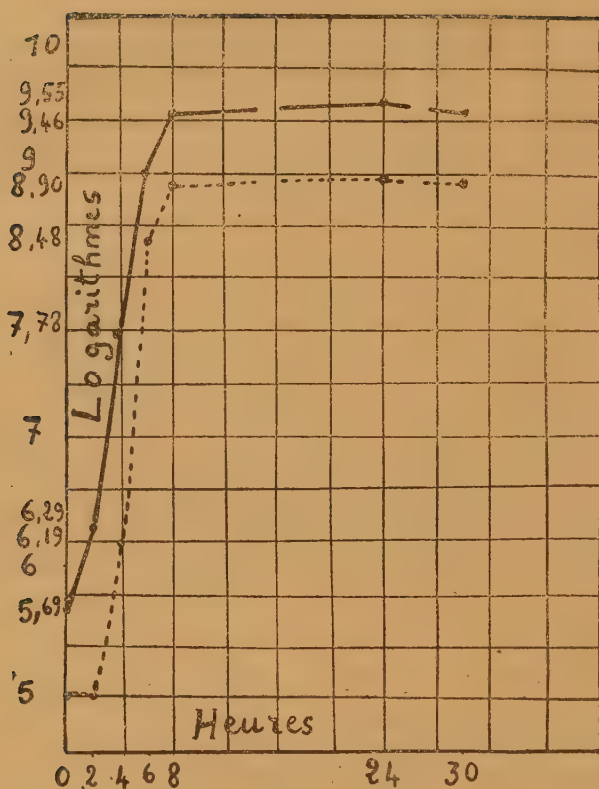
L'examen comparatif des deux courbes résultant de la numération WRIGHT-FRIES (trait plein) et de la numération sur plaques de gélose (pointillé), nous permet de constater, en accord avec les résultats de HEHEWERTH [27], WILSON [66] et A. KAPLAN [32], que le nombre des microbes visibles s'est toujours montré *supérieur* à celui des germes capables de se reproduire sur un milieu nutritif solide, ce qui ne saurait nous étonner puisque nous savons que ces derniers ne comprennent que les éléments les plus vigoureux.



EXPÉRIENCE 7. — *Microbes visibles* (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
 Ensemencement : 500.000 germes par cm³.



EXPÉRIENCE 8. — *Microbes visibles* (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
 Ensemencement : 500.000 germes par cm³.



EXPÉRIENCE 9. — *Microbes visibles* (trait plein).
Microbes repiquables (pointillé).
 Ensemencement : 500.000 germes par cm³.

Toutefois, comme les auteurs précédents, nous avons pu observer un cas (exp. 4, 8^e heure) où au même moment le nombre des germes « résistants » est sensiblement le même que celui qui exprime la totalité des microbes visibles à ce moment de l'évolution microbienne, et, dans l'essai considéré, les germes présentent donc une vigueur maximum.

Nous reviendrons d'ailleurs, au cours de notre troisième chapitre, spécialement consacré à l'étude de la résistance bactérienne, sur les résultats précédents et nous verrons comment ils permettent d'aboutir à une notion précise de la vitalité de la culture, considérée à différents moments de son évolution.

CHAPITRE II

Étude des variations de la taille du Colibacille en fonction de l'âge de la culture.

A. — Rappel des principaux travaux concernant les variations de forme chez les bactéries et conclusions des auteurs.

L'étude des variations de la forme chez les bactéries présente, comme le note GOTSCHLICH [23] (1924), au début de son travail sur la variabilité des micro-organismes, un grand intérêt, à la fois théorique et pratique. L'intérêt théorique résulte du fait que, grâce à la rapidité avec laquelle se succèdent les générations microbiennes, leur étude permet l'observation de phénomènes évolutifs généraux qui mettent plusieurs années, voire plusieurs siècles, à se produire dans une espèce animale quelconque. Quant à l'intérêt pratique des variations de la forme chez les bactéries, et notamment chez les bactéries pathogènes, il est énorme, puisqu'à ces variations morphologiques correspondent le plus souvent des modifications biologiques extrêmement importantes pour la clinique et la thérapeutique.

Pour notre part, nous nous proposons seulement de suivre les changements morphologiques du Colibacille pendant un temps limité, et seulement en fonction du facteur âge de la culture.

Nous allons cependant rappeler brièvement quelques notions générales relatives à la variabilité dans l'espèce

bactérienne, après quoi, nous examinerons les travaux des auteurs qui se sont attachés particulièrement à l'examen des changements de forme des microbes au cours de leur développement.

I. — Aperçu des principales conceptions relatives à la variabilité chez les micro-organismes : *monomorphisme, variations temporaires, variations spontanées, pléomorphisme*.

Les premiers bactériologistes partisans, à la suite des travaux de COHN et KOCH, de la théorie du monomorphisme bactérien, ne mirent pas en doute la constance des formes cellulaires et l'immutabilité de l'espèce microbienne. Ils admirent toutefois certains cas spéciaux et très définis de variations biologiques, tels que l'affaiblissement de la virulence des germes sous l'influence d'agents externes (chaleur, antiseptiques), ce qui constitue d'ailleurs le point de départ de la vaccinothérapie et de la sérothérapie. Ils reconnurent également l'existence de modifications morphologiques temporaires se produisant sous l'influence de divers agents externes physiques ou chimiques. C'est ainsi que GUIGNARD et CHARRIN [24] (1889), en cultivant le *B. Pyocyaneus* dans du bouillon nutritif additionné de divers antiseptiques (acides, sels, phénols, etc.) avaient observé des changements notables dans la morphologie et dans la biologie de ce bacille (par exemple, dans certains cas, disparition de la pyocyanine). Ainsi, par culture du *B. pyocyanique* dans des milieux additionnés de *naphthol B* (0,20 à 0,25 ‰), de *thymol* (0,50 à 0,60 ‰), les auteurs obtenaient des bacilles de différentes longueurs, isolés ou associés en filaments ou pseudo-filaments ; le *bichromate de potasse* (0,10 à 0,15 ‰) favorisait la formation des filaments, l'*acide borique* (6 à 7 ‰), celle des bacilles incurvés en boucles ou en spirilles, la *créosote* (0,75 à 1 ‰), l'*acide salicylique* (1,50 à 2 ‰), celle de cellules sphériques, etc... En ce qui concerne ces dernières formes sphériques ou coccoïdes du *B. pyocyanique*, GUIGNARD et CHARRIN les

considéraient comme des éléments spéciaux d'une résistance particulière et capables de redonner des bacilles normaux par ensemencement sur un milieu nutritif ordinaire. Ce point de vue fut confirmé en 1910, par MASSON [41] qui retrouva ces formes coccoïdes du *B. pyocyaneus* et les caractérisa comme des formes de conservation de l'espèce.

GUIGNARD et CHARRIN [24] signalèrent d'autre part que tous ces résultats pouvaient être plus ou moins influencés par des différences, mêmes faibles, des conditions de culture (nature du milieu, âge du germe, valeur de l'ensemencement, température, etc.). Ils montrèrent qu'on peut observer, en maintenant simplement les cultures de *B. pyocyaneus* à la température de 35°C. et sans aucune addition d'antiseptique, la formation de cellules enkystées, d'arthrospores, *toutes formes susceptibles de redonner des bacilles lorsqu'elles sont remises dans des conditions normales de végétation.*

Ces importants travaux permirent à leurs auteurs de mettre en évidence le caractère essentiellement *temporaire* de toutes les variations observées, et puisque le type primitif tendait toujours à reparaître lorsque les conditions de culture redevenaient normales, ils conclurent que l'espèce microbienne était douée d'une certaine *plasticité* et ils précisèrent leur position à l'égard du pléomorphisme dans les termes suivants : « Au point de vue botanique, le polymorphisme du *B. pyocyaneus* n'ébranle en rien la notion généralement admise pour l'espèce. Il n'en doit pas moins attirer de plus en plus l'attention sur l'influence des milieux et en particulier des antiseptiques, et mettre en garde contre certaines tendances à trop multiplier les espèces en se fondant sur des données physiologiques insuffisantes. »

En 1896, FLÜGGE confirma cette manière de voir en concluant de même : « En réalité, toutes les modifications morphologiques ne conduisent pas à la confusion des espèces ; au contraire, elles servent avec des moyens d'observations plus parfaits, à mieux les caractériser. »

Ces considérations expliquent encore pourquoi GUIGNARD

et CHARRIN [24], rappelant les travaux de METCHNIKOFF [44] sur le vibriion cholérique, critiquèrent les conclusions trop absolues de cet auteur. METCHNIKOFF, en effet, en cultivant dans des *conditions spéciales* (eau peptonée), la forme en virgule du vibriion cholérique, avait obtenu le passage de cette forme à une deuxième forme, en bâtonnets, et observé que cette dernière forme se maintenait constante même après passage dans la cavité péritonéale du cobaye. GUIGNARD et CHARRIN, tout en constatant l'intérêt de ces observations, précisèrent toutefois que les expériences de METCHNIKOFF n'avaient pas été suffisamment poussées pour permettre de conclure à autre chose qu'à une modification *durable*, mais qui pouvait fort bien ne pas être *définitive*.

Cependant, vers la même époque, des observations retentissantes, comme celles de HAUSER (1885), montrèrent la possibilité de variations « spontanées » chez le *B. Proteus*. Un peu plus tard, DE VRIES [64] (1902) reconnut, le premier, l'existence de variations « brusques ». Enfin, les expériences de nombreux auteurs tels que NEISSER et MAS-SINI [48] (1906), PÉJU et RAJAT [50] 1906, M^{me} V. HENRI [27 *bis*] (1914), PAUL FABRY [19] (1922), KUFFE-RATH [35] (1921), ROLIN [59] (1929), etc., constatant des modifications sensibles de la forme des bactéries sous l'influence de divers facteurs physiques ou chimiques, et les travaux plus récents de A. CH. HOLLANDE et M^{me} HOLLANDE [28 *bis*] (1931) WILLI HAUSAM [26] (1931), MARCHAL [39] (1932), PISU [53] (1934) etc..., montrèrent qu'il ne fallait pas prendre à la lettre le dogme de la fixité de COHN et KOCH.

Il semble qu'il ne faille pas non plus tomber dans l'excès contraire et adopter sans réserves les publications d'auteurs tels que NAEGELI [47] (1877), ZOPF [68] (1882), BILL-ROTH [9], etc... (1860 à 1870), qui furent les premiers à opposer à la conception monomorphiste de COHN-KOCH une théorie très largement pléomorphiste.

Comme l'ont fait récemment observer GOTSCHLICH [23]

(1924) et HENRICI [28] (1928), ces auteurs s'appuyèrent surtout sur des données spéculatives et leur hypothèse qui tend à supprimer toute barrière entre les diverses formes de bactéries correspondrait, en fait, à une véritable négation de l'espèce microbienne.

En réalité, la question de la variabilité microbienne est loin d'être résolue à l'heure actuelle. Sans prétendre examiner en détail les diverses opinions émises à son sujet, nous allons cependant rappeler ici brièvement quelques travaux dominants tendant à mettre en évidence un certain pléomorphisme bactérien, considéré comme la manifestation de l'existence d'un cycle vital chez les micro-organismes. Les principaux représentants de cette théorie sont ALMQUIST [1], HORT [29], LÖHNIS [37-38], MELLON [42] et ENDERLEIN [18].

ALMQUIST (1908-11-17-22) s'attacha plus particulièrement à l'étude des diverses espèces du groupe des bacilles Coli, Typhique et Dysentérique. Il examina surtout de vieilles cultures, sur milieux secs, conservées à basse température, dans lesquelles il nota l'apparition de formes exogènes globulaires; il admit que ces formes se produisaient, par bourgeonnement latéral ou terminal, à partir des formes normales en bâtonnets. Parmi ces formations globulaires, certaines (conidies), reproduisaient directement les formes bacillaires, alors que d'autres (sporanges), donnaient naissance de façon endogène à de nouvelles formes globulaires (gonidies). Les gonidies pouvaient dans certains cas provenir également d'une conjugaison sexuelle entre une cellule-mère (oospore) et une très petite conidie jouant le rôle de l'élément mâle.

Au cours de travaux plus récents (1924), ALMQUIST, ayant observé que les colonies provenant du mélange de cultures de *B. typhique* et de *B. dysentérique*, étaient agglutinées par l'un et l'autre sérum, crut pouvoir conclure à l'existence de formes hybrides et voir dans ce fait la confirmation de son hypothèse première relative à l'existence d'un cycle sexuel chez les bactéries.

HORT [29] (1917) observa dans les cultures de ménin-

gocoque une grande diversité de formes et nota l'apparition de petites cellules dérivant par bourgeonnement d'autres cellules plus grosses. Il signala également des structures globulaires rétractiles se formant à l'intérieur des plus grandes cellules qu'il assimila à des ascospores, considérant ainsi le méningocoque comme un champignon pléomorphe du groupe des *Ascomycètes*.

LÖHNIS [37], dans une série de publications importantes parues principalement entre 1916 et 1923, développa sa conception d'un *cycle complexe d'évolution chez les bactéries*, conception suggérée par les études qu'il fit en collaboration avec SMITH, sur le pléomorphisme très étendu du *Bacillus Azotobacter*. En effet, dès 1916, LÖHNIS et SMITH [38] signalèrent les profondes différences qui se produisaient dans la morphologie de ce bacille et qui les firent penser à des formes alternantes se succédant dans un cycle évolutif. Le cycle évolutif complexe décrit par LÖHNIS comporte la formation de « symplasmes », formations irrégulières donnant des corps régénérateurs », lesquels donneraient naissance à leur tour, plus ou moins directement, à des « formes végétatives » pouvant se conjuguer en « gonidanges » générateurs de nouvelles formes végétatives. A ces nouvelles formes végétatives succéderaient soit des arthrospores, endospores et exospores, soit des « corps régénérateurs » se divisant par scissiparité transversale pour former des bourgeons ou des « myrocystes » lesquels redonneraient des formes végétatives aboutissant à la formation d'un nouveau symplasme.

FUHRMANN [22] (1908), à la suite d'observations effectuées sur un organisme isolé de la bière, le *Pseudomonas cerevisiae*, conclut de même à l'existence d'un cycle de vie chez les bactéries ou, plus exactement, à l'existence de *deux cycles distincts* : un cycle *mineur*, ne comprenant que les changements produits dans le développement d'une *cellule*, d'une division à l'autre, et un cycle *majeur*, consistant en changements réguliers se produisant au cours de l'évolution et du vieillissement de la culture.

MELLON [42] (1919-1926) s'attacha plus particulièrement

à l'étude des variations des caractères sérologiques et culturels chez des bactéries diphtéroïdes, des colibacilles, des bacilles typhiques et des organismes fusiformes. Il adopta, comme LÖHNIS, l'hypothèse d'un cycle vital plus ou moins complexe dans lequel apparaîtraient successivement les divers types : bacilles, cocci, formes ramifiées, etc... MELLON constata en outre la possibilité de « stabiliser » l'une des formes de ce cycle, de façon à lui permettre de se reproduire directement sans avoir à passer par le reste du cycle. L'auteur ajouta que cette possibilité de reproduction directe d'un type donné (le type *bacillus* redonnant directement des bacilles, les cocci engendrant de nouveaux cocci, etc...), devait comporter la mise en œuvre d'un mécanisme sexuel.

ENDERLEIN [18] (1925) eut le mérite de développer une théorie très cohérente décrivant le cycle de vie d'une bactérie. Ce cycle comporterait, d'après cet auteur, deux processus simultanés, « un processus de multiplication », par simple division cellulaire, et un « processus de développement progressif », beaucoup plus lent, et caractérisé par une série de variations morphologiques.

Malgré le soin apporté par ENDERLEIN dans l'exposé de sa théorie, beaucoup d'auteurs ont considéré qu'il n'y avait pas lieu de retenir son hypothèse. Ils estimèrent, en effet, que l'auteur s'appuyait sur un trop petit nombre d'observations et que ses expériences n'avaient pas été conduites avec suffisamment de rigueur. D'une façon générale les critiques insistèrent sur la nécessité de se garder des conclusions trop hâtives, non en rapport avec la précision des méthodes utilisées.

Cette attitude réservée fut adoptée par de nombreux auteurs. C'est ainsi que BERGSTRAND [8] (1919-21-23), après une étude approfondie des variations morphologiques d'un organisme diphtéroïde, reconnut l'existence d'un certain pléomorphisme bactérien, mais se garda néanmoins d'affirmations trop absolues relatives au processus de ces variations de forme.

De même C. STAPP et H. ZYCHA [61] (1931), en étudiant les variations morphologiques du *B. mycoides* Flügge, cul-

tivé en goutte pendante, furent amenés à conclure que les diverses formations décrites sous le nom de « gonidies », « arthrospores », « corps régénérateurs », par les pléomorphistes, méritaient tout au plus d'être qualifiées de « modifications durables », mais que, d'une façon générale, *la théorie concluant à l'existence d'un cycle évolutif chez les bactéries demandait encore à être prouvée.*

Il est apparu, d'autre part, que les conclusions trop absolues des premiers partisans du pléomorphisme bactérien, *étaient en grande partie imputables au caractère insuffisamment rigoureux des techniques utilisées pour suivre les variations de la forme chez les bactéries étudiées.* Les auteurs plus récents insistèrent donc sur la nécessité de conduire avec une extrême prudence et une grande rigueur, les expériences relatives à l'étude des changements morphologiques chez les bactéries. En conséquence, ils accordèrent un grand intérêt à toutes les réalisations techniques qui leur permettaient de poursuivre leurs essais avec plus de sécurité. Une des réalisations les plus importantes dans ce domaine fut celle qui permit l'obtention des *cultures pures, réalisées à partir d'un seul germe.*

Nous allons passer rapidement en revue les différentes méthodes proposées pour l'obtention de ces *cultures pures* et nous examinerons ensuite les principales conclusions des auteurs qui ont abordé l'étude des variations de la forme microbienne avec des techniques vraiment dignes de confiance.

II. — *Réalisation de « cultures pures ».*

Le premier chercheur qui résolut de façon satisfaisante le problème de la culture pure fut EMIL. CHR. HANSEN. Sa méthode consistait à suivre directement sous le microscope, l'évolution d'une cellule unique de levure, cultivée en goutte pendante de gélatine, jusqu'à ce qu'elle ait donné naissance à une petite colonie à partir de laquelle on effectuait des subcultures, avec toutes les précautions en usage pour éviter une contamination par des germes étrangers.

Certains auteurs, parmi lesquels VAN SHOUTEN, BARBER [3] (1908), MALONE, ont décrit également des procédés, basés sur le même principe de culture en goutte pendante et d'observation microscopique directe, mais applicables aux bactéries. Malheureusement, dans le cas d'éléments aussi petits que les microbes, les manipulations exigées par ces méthodes sont extrêmement délicates. Comme le fait observer J. ORSKOV [49] (1922) la grande difficulté réside dans la disproportion énorme qui existe entre les bactéries à isoler et la grosseur des instruments (pipettes, loupes, etc.), mis en œuvre dans ce but. Lorsque BARBER estime possible de choisir successivement chacune des quatre bactéries se trouvant dans une goutte pendante de bouillon, et d'ensemencer ainsi quatre tubes de subcultures, J. ORSKOV écrit qu'il est permis de douter de la possibilité d'acquérir facilement une telle pratique.

Un procédé plus couramment employé et, semble-t-il, avec des résultats satisfaisants, est la méthode à l'encre de Chine de BURRI [11] (1909), dont le principe est le suivant : les bactéries sont émulsionnées dans l'encre de Chine diluée, et les petites gouttes sont déposées sur une plaque de gélatine dans une boîte de PÉTRI. Par examen microscopique, au moyen d'une forte lentille à sec, on repère les gouttes qui ne contiennent qu'une seule cellule et on suit leur développement jusqu'à formation d'une petite colonie dont on prépare des subcultures. Ce procédé présente toutefois l'inconvénient de ne pas s'appliquer à toutes les bactéries, certaines ne pouvant séjourner dans l'encre de Chine. D'autre part, la boîte de PÉTRI rend difficile l'examen au microscope.

HORT [29] (1917) fut le premier à donner une technique d'observation directe des bactéries surgélose, sans le secours d'un colorant, soit à l'aide de l'objectif à immersion, soit au moyen d'un système de lentilles de forte puissance à sec. Le procédé de HORT fut repris et perfectionné par J. ORSKOV [49] (1922) qui mit au point une technique pratique, rapide et sûre pour isoler les bactéries et obtenir des cultures à partir d'une seule cellule microbienne. Voici le prin-

cipe et les détails principaux de la méthode de J. ORSKOV :

« Le principe du procédé, écrit l'auteur, est basé sur le fait que toutes les bactéries, à l'exception d'un petit nombre de micro-organismes très petits, sont facilement distinguées par l'observation microscopique directe, sur la surface d'un milieu clair transparent tel que la gélose, la gélatine ou la gélose ascite. »

J. ORSKOV ensemencait donc, à partir d'une culture convenablement diluée, une plaque de gélose, mince et uniforme, à l'intérieur d'une boîte de PÉTRI stérile. Ceci fait, il découpait dans la plaque ensemencée, à l'aide d'une lame de canif stérilisée à la flamme, de petits cubes de gélose et il les déposait sur une lame stérile. Les petits cubes étaient ainsi examinés au microscope, soit à l'aide d'un objectif à immersion, soit à sec, à l'aide d'un système optique de forte puissance. On repérait exactement un petit espace de gélose où se trouvait une seule cellule bactérienne, en notant la position respective des échelles situées de part et d'autre du chariot mobile entraînant la lame sous l'objectif microscopique. On pouvait également utiliser dans ce but un dispositif spécial, imaginé par ORSKOV et consistant à tracer sur la lame destinée à recevoir la gélose un fin réseau de lignes dont on notait l'entrecroisement avec celles d'un oculaire micrométrique, ce qui permettait de délimiter nettement de petites surfaces sur la lame et de pouvoir les retrouver à volonté dans le champ microscopique.

L'emplacement d'une bactérie étant ainsi exactement repéré, on plaçait la lame portant la petite masse de gélose ensemencée à l'étuve à 37° c. et on effectuait des subcultures de la petite colonie développée à partir de la cellule bactérienne préalablement observée. ORSKOV précisait que le développement de la bactérie initiale peut être suivi par sa méthode, tant que la colonie qui en dérive reste petite et formée d'éléments disposés en couche unique. Si l'on désirait suivre l'évolution morphologique d'une espèce microbienne donnée au cours de son développement, il suffisait de découper et d'examiner des petits cubes de

gélose ensemencée à des intervalles réguliers, convenablement choisis, du développement de la culture.

Ayant rappelé les diverses techniques utilisables pour suivre l'évolution de la morphologie des germes d'une culture, nous allons exposer les résultats des auteurs qui ont utilisé ces méthodes telles quelles ou plus ou moins modifiées. Nous passerons ensuite à l'exposé de nos essais personnels relatifs aux variations morphologiques du Colibacille en fonction de l'âge de la culture.

III. — *Travaux antérieurs* *concernant les variations morphologiques* *des bactéries au cours de l'évolution d'une culture.*

1° L'examen microscopique d'une culture bactérienne pure, d'un âge donné, permet de constater l'existence de différences assez prononcées dans la grandeur des diverses bactéries qui la composent. Différents auteurs ont donc cherché à étudier le mode de répartition, dans une culture, des bactéries de différentes grandeurs, et certains d'entre eux ont cru pouvoir affirmer que la répartition des bactéries de grandeurs différentes autour de leur grandeur moyenne se produisait dans une culture suivant des règles très précises, selon les lois de probabilité. Ils ont ainsi pensé que l'on pouvait appliquer aux microbes la loi établie par QUÉTELET, laquelle énonce que la répartition des différentes variantes, dans une série de variations, obéit à la loi suivante : « Plus une variante diffère de la grandeur moyenne, plus elle est rare, au contraire plus une variante se rapproche de la grandeur moyenne, plus elle est fréquente. »

Un grand nombre de travaux sur l'anthropométrie, la zoologie et la botanique ont montré que cette loi de QUÉTELET s'applique à tous les être vivants.

J. TROTZKY [62], en 1913, travaillant sur les bactéries, démontra le premier que la répartition, apparemment accidentelle, des bactéries suivant leur grandeur dans une culture, suivait en réalité les lois de la théorie de la pro-

babilité et que la loi de QUÉTELET s'étendait à l'espèce microbienne. En 1916, BARUCH fit observer que l'on pouvait reprocher à J. TROTZKY de ne pas avoir suffisamment tenu compte, dans ses expériences, de l'influence exercée par l'âge de la culture sur la grandeur des bactéries. Il entreprit donc la vérification de la loi de QUÉTELET, en particulier sur le *B. du Charbon*, en ayant soin de ne comparer que des microorganismes *du même âge*, ou tout au moins appartenant à *une même phase* de la poussée.

W. L. TROTZKY [63], reprenant en 1929 les travaux de J. TROTZKY, chercha à étendre les conclusions de son prédécesseur en opérant sur un plus grand nombre de souches bactériennes, de façon à voir s'il était possible d'établir un coefficient de variations des grandeurs caractéristiques de chaque souche étudiée. Un tel coefficient aurait présenté en effet l'avantage de permettre d'effectuer des cultures pures, non seulement à partir d'une espèce bactérienne donnée, mais aussi à partir d'une variété de cette même espèce, en l'isolant d'un mélange de bactéries de souches différentes, et dont toutes les autres propriétés, culturales ou sérologiques, sont identiques.

W. L. TROTZKY a fait remarquer que ce coefficient de variations, pour être vraiment « caractéristique » devait exprimer exactement *l'ensemble des variations produites*. Par conséquent, on devra tenir compte, non seulement du *caractère variant le plus fréquemment observé* (qui peut être donné par une simple moyenne arithmétique), mais encore de *l'étendue* des variations, et de la *fréquence* des différentes variantes dans la série des variations.

Nous ne rapporterons pas ici la suite des calculs qui ont permis à W. L. TROTZKY d'établir, d'après ses données expérimentales, des courbes exprimant véritablement *l'ensemble* des variations observées, en mettant en valeur la caractéristique essentielle de chaque groupe de variations étudié. Nous nous contenterons de rappeler que, effectuant le rapprochement entre les courbes de variations obtenues par cet auteur et les courbes de variations théoriques, telles qu'elles résultent de l'application de la loi de QUÉTE-

LET, W. L. TROTZKY est arrivé à la conclusion que les courbes empiriques traduisent bien l'expression de la même loi, mais sont des courbes « excessives à sommet plus haut que la courbe théorique », ce qui revient à dire qu'il observe davantage de formes longues et moins de formes courtes dans une même série de variations, qu'il ne fallait s'y attendre théoriquement.

La technique de W. L. TROTZKY consistait à effectuer un grand nombre d'étalements microbiens, à les colorer à la fuchsine, et à projeter sur un écran, à l'aide d'un appareil micro-photographique, les images des bactéries ainsi obtenues. L'agrandissement réalisé était de 5.000 environ. Les figures obtenues étaient dessinées au crayon sur l'écran, puis mesurées. Comme l'a fait observer l'auteur, les chiffres des dimensions bactériennes donnés par ce procédé ne correspondent pas à la valeur absolue de la grandeur des microbes, la coloration à la fuchsine provoquant toujours un certain rétrécissement de la cellule bactérienne.

Les expériences de W. L. TROTZKY ont porté principalement sur différentes souches de B. Typhique et de bacille dysentérique SHIGA-KRUSE. Les germes de chaque souche ont été souvent mesurés, au cours de générations différentes et pendant plusieurs mois, mais toujours sous les mêmes conditions externes, c'est-à-dire que ces germes appartenaient à des cultures sur gélose maintenues à 37 c. et âgées de 24 heures.

L'auteur est arrivé aux constatations suivantes :

a) il existe, pour chaque souche, une courbe *individuelle* de variations et les valeurs qui caractérisent cette dernière courbe peuvent être considérées comme des valeurs *constantes pour chaque souche*.

b) la longueur des bactéries étant un signe *caractéristique de chaque souche*, il est possible d'effectuer des cultures pures à partir d'un mélange de souches d'une même espèce, possédant par ailleurs des propriétés identiques ;

c) la longueur des bactéries paraît être un signe *héréditaire*.

ditaire, car les différents facteurs (température, âge, milieu de culture), capables de modifier *temporairement* la longueur des bactéries, sont insuffisants, d'après les expériences de l'auteur, à changer les propriétés héréditaires qui se manifestent dans la longueur des bactéries issues d'une même souche. Le passage sur l'animal serait même incapable, d'après W. L. TROTZKY, de modifier la grandeur caractéristique des bactéries d'une souche bactérienne. Après injection à des souris blanches d'émulsions effectuées à partir de cultures sur gélose de B. typhique et de B. de SHIGA-KRUSE, l'auteur a obtenu, en effet, à partir du sang cardiaque de ces animaux, des cultures présentant les mêmes grandeurs caractéristiques que celles qui avaient servi à l'injection.

Si nous nous sommes étendue un peu longuement sur les travaux de W. L. TROTZKY, c'est parce que ses conclusions sont d'une grande importance en ce qui nous concerne. En effet, puisque, d'après cet auteur, la longueur microbienne est un signe *caractéristique et constant*, pour une souche donnée, à un âge donné, *il est évidemment possible d'établir une relation entre les variations de grandeur des bactéries et l'âge des cultures qui les renferment.*

2° *Les variations de taille des bactéries au cours de l'évolution de la culture se retrouvent-elles selon un rythme constant, pour une souche donnée, et ce rythme de variations permet-il éventuellement de caractériser cette souche ?*

A ce sujet, c'est BARUCH [4] (1916) qui, après avoir entrepris de vérifier les travaux de J. TROTZKY, insista le premier sur la grande importance des relations existant entre la *longueur* des bactéries et l'*âge* de la culture à laquelle elles appartiennent. Il s'attacha particulièrement à l'étude des longueurs du B. typhique et à celles du B. du Charbon sporulés, et trouva que les formes *les plus courtes* correspondaient aux périodes de poussée *les plus actives*. Mais c'est à CLARK et RUEHL [14] (1919) que revient le mérite d'avoir effectué, pour la première fois, une étude *systématique et suivie* des variations morphologiques des

bactéries au cours de l'évolution de la culture. Leurs observations portèrent sur les variations de taille, de forme, ainsi que sur les changements observés dans la coloration des bactéries, au cours du développement d'une culture.

Les observations de CLARK et RUEHL ont porté sur 37 espèces bactériennes. Après avoir vérifié soigneusement la pureté des cultures originales, les auteurs effectuaient des cultures par repiquage après 24 heures, puis 48 heures. Ces dernières cultures étaient ensuite examinées, à des intervalles très rapprochés, pour y suivre l'évolution de la poussée et les variations de forme des bactéries à l'étude. C'est ainsi que CLARK et RUEHL faisaient des prélèvements aux heures suivantes :

1, 2, 4, 6, 9, 12, 18, 21, 24 et 48 heures, puis examinaient à nouveau les cultures au 7^e jour.

Les préparations étaient colorées au bleu de méthylène et les mesures de grandeur déterminées soigneusement par la méthode du micromètre oculaire. CLARK et RUEHL prirent au hasard 10 éléments microbiens à chaque mesure et notèrent la moyenne des longueurs en inscrivant la plus grande et la plus petite taille observées et les moyennes servaient à l'établissement des courbes de variations.

Les auteurs purent ainsi constater l'existence d'une *différence profonde* entre la forme des cellules appartenant aux *cultures jeunes* et la forme des cellules appartenant aux *cultures de 24 heures*. Ils conclurent de leurs observations que, dans les milieux de cultures ordinaires, les bactéries subissent des changements morphologiques frappants, coïncidant avec les différentes phases de la multiplication. C'est ainsi que pendant la phase dite « de latence », il ne se produisait pas de changements morphologiques frappants, mais au bout de 2 heures, les bactéries se coloraient mieux et leurs contours étaient plus nets. Au contraire, pendant la période de « multiplication logarithmique » les bactéries subissaient des changements *extrêmement importants*, leur taille pouvant, en particulier, augmenter jusqu'à atteindre 2 à 6 fois celle des bactéries observées dans une souche de 24 heures. Après 6 à 8 heures de culture, les bac-

téries passaient graduellement dans la période de multiplication stationnaire pendant laquelle le nombre des cellules restait relativement constant. Pendant cette progression, jusqu'à la phase stationnaire, la taille des bactéries diminuait progressivement jusqu'à atteindre la longueur des cellules des cultures de 24 heures. Les auteurs observèrent d'autre part, dans ces cultures de 24 heures, ou dans des souches plus âgées, des formes dites d'« involution », prenant mal ou irrégulièrement la coloration et correspondant à des formes bizarres, très différentes de celles des cellules normales donnant les images classiques des livres.

ARTHUR T. HENRICI [28], dans une série de publications parues entre 1921 et 1928 s'attaqua à son tour au problème des variations morphologiques des bactéries. Ses essais portèrent particulièrement sur le *B. Megatherium*, le vibron cholérique et le *B. Coli*. Il eut l'idée d'établir une relation entre le développement des cultures bactériennes et les variations morphologiques concomitantes des germes. Dans ce but, HENRICI suivit la multiplication des microbes en effectuant, soit des cultures sur milieux solides (gélose inclinée en général), soit, plus rarement, des cultures en bouillon. L'ensemencement du bouillon ou de la gélose était effectué à partir d'une suspension microbienne en eau stérile, à l'aide d'une anse de platine, et aussi uniformément que possible lorsqu'il s'agissait d'un milieu solide (bouillon et gélose étaient des milieux standards, à l'extrait de bœuf, ajustés à $pH = 7$). Les numérations microscopiques étaient faites, pour le *B. Megatherium*, par numération directe, au moyen de la chambre de numération de HELLER. Pour les organismes plus petits, comme le *B. Coli*, HENRICI employait une technique de numération spéciale, utilisant le principe de la numération DE BREED et BREW [9 bis] pour les bactéries du lait, et la méthode de la coloration négative de BEMANS [7]. Voici cette technique : une quantité donnée de la suspension microbienne à examiner était mélangée à un égal volume de solution de rouge Congo à 2%; 0,01 cm³ de ce mélange était étalé aussi uniformément que possible sur 4 cm² de la surface d'une lame de verre

très propre. Après dessiccation la préparation était placée dans une solution alcoolique de ClH à 1 %, servant à la fixer et à provoquer le virage du rouge Congo en bleu foncé. On comptait alors le nombre des cellules dans un certain nombre de champs microscopiques (une centaine environ, répartis sur 5 lames), et tenant compte de la surface d'un champ, de la surface de l'étalement et du volume étalé, on calculait le nombre des éléments contenus dans 1 cm³ de la suspension bactérienne en expérience.

Cette méthode permettait, d'après l'auteur, *de distinguer directement les bactéries vivantes dans une culture microbienne*, de telles bactéries apparaissant en clair sur la préparation. Après fixation et dessiccation, les cellules subissaient un rétrécissement, mais l'espace clair sur la lame reproduisait fidèlement la taille et la forme des cellules vivantes humides. Toutefois, dans le cas des cultures en milieux liquides, les préparations au rouge Congo n'étaient pas très nettes, la peptone de ces milieux précipitant le colorant, il fallait alors centrifuger les cultures et remettre les bactéries en suspension dans des volumes déterminés de solutions aqueuses ou salines.

HENRICI nota que *dans les cultures jeunes, aucune des cellules ne présentait de portions colorées au rouge Congo*, et la cellule entière apparaissait comme un espace clair sur la lame. Au contraire, les cellules colorées devenaient de plus en plus nombreuses au fur et à mesure du vieillissement de la culture. L'auteur en a conclu qu'il s'agissait dans ce cas de *cellules mortes* dont la réaction vis-à-vis du rouge Congo est différente, peut-être à cause d'un début d'autolyse.

Pour effectuer les mesures de grandeur des bactéries, HENRICI a employé des procédés différents, suivant la grosseur des éléments à examiner :

dans le cas des cellules, relativement grandes, du *B. Megatherium*, il projetait directement les préparations microscopiques sur un écran, à l'aide d'un système optique donnant un agrandissement de 3.000 diamètres environ. Les images obtenues étaient dessinées et mesurées. Parfois HENRICI utilisait également la chambre claire. Pour les

organismes plus petits (*B. Coli* en particulier), l'auteur a effectué des microphotographies, avec un grossissement variant de 2.000 à 3.000 diamètres. Les négatifs photographiques étaient encore agrandis de 7 à 10 fois et projetés sur un écran. Le grossissement final était donc en moyenne égal à 20.000.

En utilisant les méthodes précédentes, HENRICI a pu obtenir les résultats suivants :

a) En ce qui concerne le développement des bactéries, l'auteur a retrouvé les phases décrites par ses prédécesseurs et constaté en particulier l'analogie existant entre la courbe de multiplication des micro-organismes et la courbe établie par PEARL [49 bis] (1925) pour l'évolution des organismes supérieurs.

b) Au point de vue de la morphologie bactérienne HENRICI confirma les principaux points établis précédemment par CLARK et RUEHL et nota en particulier la *profonde différence* existant entre les cultures *jeunes* et les cultures de 24 heures, ainsi que l'accroissement de la taille des bactéries au cours des premières heures de l'évolution microbienne, fait surtout net pour les petits ensemencements.

c) En rapprochant les variations morphologiques observées et les phases de la multiplication pendant lesquelles elles se manifestaient, HENRICI est arrivé aux conclusions suivantes :

α) *La taille des cellules augmente avant que se soit effectuée la première division cellulaire* ; autrement dit il se produit un allongement des bactéries pendant le « temps de latence » observé par les auteurs dans l'étude de la multiplication microbienne.

β) Dans les cultures de *B. Coli* âgées de 3 heures, on note un *épaississement* très net des éléments microbiens.

γ) Pendant la période de poussée maxima, ou période de *multiplication logarithmique*, on constate un *accroissement très prononcé de la taille des cellules*, atteignant son maximum probablement au point où la courbe de poussée passe

de l'accélération positive à l'accélération négative, c'est-à-dire au moment où la valeur de poussée est la plus forte.

δ) Après cette période les cellules reviennent graduellement à leur taille originale qui est celle observée dans les cultures de 24 heures. Cette taille est atteinte au moment où les cellules entrent dans la phase de repos et les fluctuations qui se produisent à partir de cette période jusqu'à la fin de la période d'observation sont légères et probablement sans signification.

L'ensemble de ces résultats a été résumé par HENRICI comme il suit : « Le principal fait établi par mes études est que la morphologie des bactéries varie d'une façon continue quand augmente l'âge de la culture dans laquelle elles poussent, la transition d'un type à un autre se produisant aux points d'inflexion entre les phases de la courbe de poussée. »

En ce qui concerne les essais réalisés sur le Colibacille, les mesures d'HENRICI portèrent non seulement sur les *variations de taille*, mais aussi sur les *variations du diamètre* de ce bacille. A partir des microphotographies projetées sur un écran avec un grossissement total de 30.000, HENRICI a établi un « index surface longueur ».

$$\text{Index surface-longueur} = \frac{\text{Surface image projetée}}{\text{longueur au carré}}.$$

Comme l'a fait observer l'auteur, cet index est une excellente mesure de la forme du *Bacille Coli*, au moins pendant les premières heures de la culture où les formes asymétriques sont très rares. Il permet d'autre part de constater que, *proportionnellement à la longueur, l'accroissement en largeur est faible*. Il est à noter que MINOUX [43] (1927) avait pu conclure, en s'appuyant uniquement sur des considérations mathématiques théoriques, que les cellules bactériennes doivent croître beaucoup moins dans le sens de la largeur que dans le sens de la longueur.

Parmi les différents types morphologiques rencontrés par HENRICI au cours de l'évolution d'une culture microbienne, et en particulier au cours de ses essais sur le Coli-

bacille, se trouvaient trois catégories principales d'éléments bactériens :

1° Des éléments que l'auteur appelle « cellules embryonnaires ». Ces éléments rencontrés dans les jeunes cultures sont caractérisés par le fait qu'ils se colorent beaucoup plus fortement que les autres par les colorants basiques. Ces éléments possèdent un pouvoir d'accroissement et un pouvoir de division beaucoup plus forts que celui des cellules prises à d'autres périodes du développement de la culture, et sont d'après HENRICI, caractéristiques de la phase de multiplication active, c'est-à-dire de la phase dite « logarithmique ». CLARK et RUEHL [14] avaient déjà noté ces faits de la façon suivante : « Le rapport entre le moment où se produisent les formes longues et épaisses et le moment où se produit la poussée maxima de la culture est évident. » Mais les auteurs ajoutaient : « Il est évident aussi que la culture avec un temps de génération moyen très petit, doit présenter une majorité de formes en division ou presque prêtes pour une nouvelle division. » Ce dernier point a été rejeté par HENRICI pour lequel les cellules des jeunes cultures présentent « un type morphologique spécial » et sont aussi profondément différentes du type standard des cellules de 24 heures, que les formes vieilles dites d' « involution » présentées par les cultures âgées ; autrement dit *la plus grande longueur présentée par les bactéries pendant la phase active est un phénomène biologique qui n'a rien à voir avec les exigences de la multiplication.*

HENRICI a complété ses observations à ce sujet en donnant une interprétation physique de la puissance d'accroissement des cellules jeunes. Pour lui, la synthèse du protoplasme cellulaire se fait pendant les premières heures de la poussée avec une vigueur plus forte et une rapidité supérieure à la vitesse de division, ce qui entraîne un accroissement de la taille des éléments bien supérieur à celui qui serait nécessité par les seules exigences de la division elle-même.

2° *Les formes mûres et différenciées* qui commencent à se

développer dans les cultures au moment où elles atteignent la phase de multiplication stationnaire, ou période d'accélération négative de la poussée, représentent exactement, d'après HENRICI, l'inverse des cellules embryonnaires. C'est ainsi que ces éléments, dans la plupart des espèces microbiennes, correspondent à des formes plus courtes, se rapprochant de la forme ovale ou sphérique, leur taille est plus fixe, mais leur forme plus variable, et elles retiennent moins fortement les colorants basiques. En outre de telles formes sont très « différenciées », non dans le sens où l'on entend en général la différenciation pour les organismes multicellulaires, car leur forme et leur structure interne varient peu, mais elles présentent des parties différenciées, telles que spores et granulations à l'intérieur du protoplasme, ce qui, d'après l'auteur, correspond aux structures « paraplasmiques » internes des cellules différenciées d'un organisme multicellulaire, et qui sont, soit le résultat, soit la cause, de leurs diverses fonctions.

3° *Les formes vieilles* commencent à se développer avec le début de la phase de mort, mais leur rapport avec cette phase ne semble pas aussi net que pour les autres formes. Elles sont caractérisées par l'accroissement de la variation des formes des cellules, leur affinité moindre pour les colorants basiques et plus accentuée pour les colorants acides, et surtout *par une proportion croissante d'éléments déformés*. De telles formes paraissent à HENRICI plus en rapport avec le *degré d'autolyse* qu'avec le degré de mort proprement dit.

A la même époque, JENSEN [31] a publié une série importante de recherches sur l'évolution morphologique des bactéries au cours du développement d'une culture.

Ses essais portèrent en particulier sur le *B. Coli*. La technique utilisée par JENSEN, dérivée de la technique d'ORSKOV que nous avons décrite plus haut (p. 62), consistait à ensemer des cubes de gélose, conservés en chambre humide à l'étuve, et à les observer, à intervalles de temps très rapprochés, à l'aide d'un système optique de forte puissance, à sec.

Plusieurs séries d'observations portant sur des ensemencements effectués à partir de souches de *B. Coli* âgées respectivement de 3 heures, 18 heures et 2 jours $\frac{3}{4}$, ont permis à l'auteur de faire les constatations suivantes :

a) *En ce qui concerne la multiplication microbienne*, JENSEN retrouva les différentes phases décrites par les auteurs antérieurs. Cependant, dans le cas d'ensemencement à partir d'une souche de *B. Coli* âgée de 3 heures, il constata que les bactéries ensemencées commençaient à se diviser, dès les premières heures de la culture, avec une rapidité maxima et uniforme ; autrement dit, lorsque la souche servant à l'ensemencement se trouvait dans la phase de *multiplication logarithmique*, il y avait *suppression du temps de latence* dans les cultures.

Au contraire, les ensemencements effectués à partir des souches de 18 heures et 2 jours $\frac{3}{4}$ ont permis l'observation d'un *temps de latence*, plus prolongé dans le cas de la souche la plus âgée.

b) *Les recherches relatives aux variations morphologiques des germes, en fonction des différentes phases de poussée auxquelles ces variations correspondaient*, donnèrent lieu aux observations suivantes :

1. Pendant la période suivant immédiatement l'ensemencement, dans le cas où celui-ci avait été fait à partir des souches de 18 heures ou de 2 jours $\frac{3}{4}$, c'est-à-dire pendant la période dite de « latence », les bactéries se trouvaient à l'état de petites formes, appelées par l'auteur « petites formes permanentes ». JENSEN observa un grossissement de ces petites formes au cours de la période de latence.

2. Pendant la période logarithmique les petites formes précédentes avaient entièrement disparu pour donner naissance à de grandes formes, très réfringentes et se révélant toutes capables de germer par transport sur un milieu neuf. En effectuant des mesures sur la capacité de germination des cultures à différents moments de la poussée, JENSEN observa que la période logarithmique présentait un « opti-

mum de germination », c'est-à-dire présentait un pourcentage particulièrement élevé de bactéries capables de se développer après transport dans un milieu de subculture approprié. D'autre part, JENSEN démontra également que les « grandes formes réfringentes » de la période logarithmique présentaient une vitesse de division maxima, ce qui les fit désigner par l'auteur : « grandes formes de croissance ».

3. Vers la fin de la période logarithmique l'auteur a signalé l'apparition, à côté des « grandes formes de croissance », d'un certain nombre de formes longues, peu réfringentes, très pâles, presque transparentes et surtout *incapables de germer* dans les conditions de l'expérience. Ces formes sont appelées par l'auteur « grandes ombres bactériennes ».

JENSEN constata que le nombre des ombres bactériennes augmentait assez rapidement jusqu'au moment où, brusquement, elles disparaissaient. En même temps les grandes formes de croissance caractéristiques de la période de multiplication logarithmique se transformaient, tout aussi brusquement, en petites formes, très réfringentes, toutes capables de germer, mais avec une vitesse de division plus faible que celles des grandes formes de croissance. D'après JENSEN, c'est l'apparition de ces « petites formes », coïncidant avec la disparition des « ombres bactériennes » incapables de germer, qui produisait un « deuxième optimum de germination » dans les cultures à cette période. Mais comme les nouvelles formes avaient une énergie de croissance moindre, la phase de croissance logarithmique prenait fin à leur apparition.

4. Pendant la période suivante de la multiplication, la grandeur des bactéries diminuait de plus en plus, en même temps que s'affaiblissait leur vitesse de croissance. Puis l'auteur constata l'apparition de petites formes peu réfringentes, marquant le début de la période de déclin de la poussée.

Des essais effectués sur des cultures en bouillon donnèrent à l'auteur des résultats identiques à ceux fournis par les cultures sur bouillon gélosé.

c) *Recherches sur l'origine des « ombres bactériennes »*. — JENSEN s'attacha à déterminer les causes de l'apparition dans les cultures, à la fin de la période logarithmique, de ces formes longues, peu réfringentes, incapables de germer, qu'il a appelé « grandes ombres bactériennes ». Il arriva à conclure que ces formes étaient la résultante d'un phénomène biologique, lié à la croissance des bactéries. Le fait de leur apparition, toujours au même moment de l'évolution microbienne, prouverait, d'après l'auteur, *une moindre résistance des éléments microbiens à cette période*. Quant aux causes véritables de ce phénomène, JENSEN les a rattachées, de même que celles qui provoquent la transformation des « grandes formes de croissance » de la période logarithmique en « petites formes » à capacité de croissance moindre, à deux faits principaux :

1. *Une action nocive*, exercée par les produits du métabolisme microbien sur les grandes formes et les transformant en « ombres bactériennes », cette action nocive n'ayant plus de prise lorsque les grandes formes se sont transformées en « petites formes de croissance » plus résistantes.

2. *L'épuisement* du milieu en une substance facilement accessible pour la construction de la cellule bactérienne.

Enfin, d'autres recherches sur les « ombres bactériennes » amenèrent JENSEN à conclure que ce n'étaient pas des bactéries *mortes*, mais seulement des formes *peu résistantes*. L'auteur trouva une confirmation de cette assertion dans le fait que l'addition d'un bactériophage, à des cultures d'âges différents, montrait que la bactériolyse ne se produisait qu'à partir de l'apparition des « ombres bactériennes » dans la culture, et cessait dès que la période de croissance des petites formes était atteinte, ce qui tend à démontrer la moindre résistance de la culture à la période d'apparition des « ombres bactériennes ».

A la suite de JENSEN d'autres auteurs poursuivirent l'étude des variations morphologiques des bactéries, sous l'influence de divers facteurs, et précisèrent les meilleures conditions à observer pour réaliser cette étude. C'est ainsi que JANKE et HOLZER [30] (1928) mirent en évidence la supériorité des méthodes statistiques pour donner une idée précise de l'importance et de la signification réelle des variations observées. A. PIJPER [52] (1929) apporta une nouvelle technique de mesure de la grandeur des bactéries, utilisant le phénomène de diffraction de rayons lumineux à travers les cultures.

Plus récemment, en 1932, D. S. MARTIN [39 bis] présenta des données relatives à la dimension des cellules de *B. Coli*, à 1/2 heure d'intervalle. Cet auteur constata que les cellules les plus grandes étaient observées 1 heure, 1 heure 1/2 et 2 heures après l'ensemencement, et que les dimensions se réduisaient très rapidement au cours du développement logarithmique. Ces résultats sont en plein accord avec ceux obtenus précédemment par HENRICI. D'autre part, S. BAYNE-JONES et E. F. ADOLPH [5] (1932) et S. BAYNE-JONES et L. A. SANDHOLZER [6] (1933) ont élaboré et confirmé à la fois les résultats de HENRICI et de MARTIN, concernant la dimension des cellules du *B. Coli* au cours des phases variées du cycle de vie.

Le rappel complet des nombreux travaux consacrés au problème de la variation morphologique des bactéries nous entraînerait trop loin. Nous avons dû nous limiter à l'énumération de ceux qui se rattachaient plus particulièrement à nos propres recherches.

Nous allons effectuer maintenant l'exposé de nos expériences personnelles sur l'évolution de la taille du *B. Coli* au cours du développement des cultures en bouillon. Auparavant, et dans le but de justifier la technique que nous avons suivie, rappelons que nous nous sommes proposé de suivre les variations de la taille du Colibacille, au fur et à mesure du vieillissement de la culture, afin d'établir :

a) le rapport existant entre ces variations de la taille des

bacilles et les *diverses phases de la multiplication microbienne*.

Dans ce but nous avons effectué les mesures des bactéries sur des préparations en tous points comparables à celles qui nous servaient pour les expériences de numération microscopique indirecte par la méthode de WRIGHT-FRIES (numération des germes totaux).

b) le rapport existant entre les *variations de la taille* et les *variations de vitalité* de la culture, au fur et à mesure de son vieillissement.

* Pour cela nous avons établi, à l'aide d'un grand nombre de mesures des microbes existant dans la culture, à chaque période considérée de son évolution, une « longueur moyenne type », exprimant la *moyenne des longueurs les plus fréquemment observées dans le milieu à cette période*. C'est à cette longueur moyenne type qu'il convenait d'attribuer par conséquent le caractère de vitalité de la culture, mesuré à chaque moment considéré.

B. — Essais personnels.

Le simple examen des lames que nous avions préparées en vue de procéder à la numération des germes par le procédé de numération de WRIGHT-FRIES, nous avait déjà permis de constater des modifications très nettes de la morphologie du Colibacille, au cours de l'évolution des cultures. Nous avons pu noter en particulier, que ces modifications étaient particulièrement accentuées pendant la période dite de « multiplication logarithmique ».

Nous avons donc pensé tout d'abord à effectuer nos mesures de la grandeur du *B. Coli* en nous servant des lames préparées pour le dénombrement microscopique de ces germes. Après quelques expériences, nous nous sommes rendu compte que le nombre des bactéries mesurées ainsi était trop faible pour nous permettre d'en déduire la grandeur moyenne des germes existant dans la culture à chaque période considérée de son évolution. Nous avons

donc entrepris, pour effectuer l'étude des variations de la taille des bacilles, en fonction de l'âge de la culture à laquelle ils appartiennent, une série de mesures portant sur un très grand nombre de germes ; pour cela nous avons préparé des étalements microbiens spécialement destinés à cette étude, étalements beaucoup plus chargés en bactéries que ceux qui servaient à nos essais de numération et qui, d'autre part, ne contenaient pas de cellules de levure, désormais inutiles.

Le milieu de culture choisi pour cette nouvelle série d'expériences était, comme dans les essais de numération, le bouillon simple, peptoné, salé ; 100 cm³ de ce bouillon étaient ensemencés, comme précédemment, en partant d'une souche de *B. Coli* sur gélose nutritive inclinée, âgée de 24 heures et cultivée à 37° c. Nous avons simplement augmenté largement la valeur de cet ensemencement initial en n'effectuant aucune dilution préalable des germes, et en introduisant directement une anse de microbes prélevés dans la culture sur gélose inclinée dans les 100 cm³ du bouillon à ensemenecer.

Les prélèvements destinés à suivre l'évolution morphologique des germes ont été effectués à partir de la culture en bouillon, maintenue à l'étuve à 37° c, aux heures suivantes :

0 heure (ensemencement), 1^{re}, 2^e, 3^e, 4^e, 5^e, 6^e, 7^e, 8^e, 10^e, 12^e, 24^e, 30^e et 48^e heure après l'ensemencement.

A partir de ces prélèvements, nous avons effectué des étalements sur lames, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, fermée à une extrémité, suivant la technique qui nous avait servi à faire les préparations destinées à la numération microscopique WRIGHT-FRIES. Pour la coloration des germes ainsi étalés et fixés par le mélange alcool-éther, nous avons essayé divers procédés et notamment l'emploi du bleu de KHÜNE et de la double coloration de GRAM, mais les préparations obtenues ainsi ne présentaient aucune supériorité sur notre méthode habituelle de coloration à la fuchsine de Ziehl diluée à 1/5^e. C'est donc ce dernier procédé

de coloration que nous avons finalement conservé pour l'examen morphologique des germes. Les étalements microbiens ainsi préparés et colorés, et correspondant à chaque période déterminée de l'évolution de la culture, étaient utilisés pour mesurer la grandeur des bacilles. Ces mesures étaient faites en combinant l'emploi du microscope et de la chambre claire, ce qui nous permettait de dessiner l'image des germes observés, puis de mesurer la longueur de chaque dessin au moyen d'une règle graduée en millimètres. Nous avons ainsi dessiné et mesuré, pour chaque prélèvement, un minimum de 600 images.

Connaissant le grossissement du système optique employé (oculaire n° 8 et objectif à immersion 1/15^e) un calcul simple nous indiquait, comme nous le verrons plus loin, la dimension, exprimée en μ de chaque élément microbien correspondant.

En ce qui concerne l'épaisseur des germes considérés, leur mesure est trop délicate, dans le cas du Colibacille, pour être obtenue par le procédé de la chambre claire. Comme d'autre part l'importance des variations de grosseur est très faible par rapport aux énormes fluctuations de la longueur, nous nous sommes bornée à la seule mesure de la grandeur, tout en accompagnant les chiffres obtenus d'indications générales sur la forme des microbes observés. Nous avons effectué 3 expériences portant sur l'étude de l'évolution de la taille du *B. Coli*, en fonction de l'âge de la culture. Chacun de ces essais a été poursuivi dans des conditions expérimentales exactement semblables et les résultats numériques obtenus ont permis l'établissement des courbes traduisant les variations de la « longueur moyenne » des germes au fur et à mesure de l'évolution de la culture.

Nous allons décrire en détail une de ces expériences et donner un aperçu des calculs qui nous ont permis de coordonner tous les résultats obtenus.

DÉTAIL D'UNE EXPÉRIENCE

a) Détermination du grossissement du microscope.

Le système optique utilisé pour l'examen et la mesure des variations de longueur du *B. Coli* comprenait :

1 objectif à immersion 1/15^e.

1 oculaire n° 8.

Le grossissement obtenu dans ces conditions a été déterminé par le procédé classique combinant l'emploi de la chambre claire, fixée sur l'oculaire et d'une échelle micrométrique, placée sur la platine du microscope. Chaque intervalle compris entre deux divisions de l'échelle micrométrique, égal à 10 μ , soit 1/100^e de millimètre, donnait une image de 10 millimètres.

Le grossissement était donc :

$$\frac{\frac{10}{1}}{\frac{1}{100}} = 1.000.$$

Si nous supposons que la longueur de l'image d'un Coli-bacille, obtenue avec le même système optique et par le même procédé de la chambre claire, est égale à 3 millimètres ; la taille de ce microbe, exprimée en μ (1/1.000^e de mm.) sera :

$$\frac{3 \times 1.000}{1.000} = 3 \mu.$$

b) Ensemencement du milieu.

Un volume de 100 cm³ de bouillon de viande peptoné salé était ensemencé avec le contenu d'une anse de platine de bacilles, prélevés dans une culture de *B. Coli* âgée de 24 heures. Cette culture avait été effectuée sur gélose nutritive inclinée, et à la température de 37° c.

c) Mesure des grandeurs des éléments microbiens dans la culture au moment de l'ensemencement et détermination de la « grandeur moyenne » correspondant à cette période.

Aussitôt après l'ensemencement, le bouillon était agité pour obtenir une émulsion microbienne homogène. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, nous prélevons $1/2 \text{ cm}^3$ environ de la culture, et nous en déposons 1 goutte sur chacune des 3 lames disposées à cet effet, les lames étant propres et bien dégraissées par séjour dans l'alcool-ammoniacal. Les étalements étaient réalisés à l'aide d'une autre pipette Pasteur, fermée à son extrémité, et, après dessiccation et fixation par le mélange alcool-éther, la coloration des germes était réalisée en faisant agir, pendant 15 minutes environ, une solution de fuchsine de Ziehl diluée à $1/5^e$.

Après lavage à l'eau distillée, les préparations ainsi obtenues étaient examinées au microscope et dessinées grâce au dispositif de la chambre claire. Les dessins obtenus étaient ensuite mesurés à l'aide d'une règle graduée en millimètres, et le calcul indiqué plus haut nous permettait de dresser un tableau sur le modèle suivant :

EXPÉRIENCE 1.

Prélèvement de l'heure 0 (départ).

Total des germes mesurés = 450.

Nombre des germes de chaque longueur	Taille exprimée en μ	Pourcentage des germes de chaque longueur
5	1	1,10
46	1,5	10,22
104	2	23,11
105	2,5	23,33
74	3	16,44
43	3,5	9,66
24	4	5,33
14	4,5	3,11
13	5	2,84
4	5,5	0,88

Nombre des germes de chaque longueur	Taille exprimée en μ	Pourcentage des germes de chaque longueur
8	6	1,77
2	6,5	0,44
1	7	0,22
1	7,5	0,22
2	8	0,44
1	8,5	0,22
1	10,5	0,22
1	12	0,22
1	13	0,22

Si nous nous reportons à la loi énoncée par QUÉTELET :
 « Plus une variante diffère de la grandeur moyenne plus elle est rare, au contraire plus une variante se rapproche de la grandeur moyenne, plus elle est fréquente », nous voyons que le tableau ci-dessus est une illustration fidèle de cette loi. Ces valeurs nous permettent de déterminer la « *grandeur moyenne* » des microbes, grandeur appartenant au plus grand nombre des éléments mesurés et correspondant, pour cette première période d'observation à la taille de $2\ \mu\ 5$ à $2\ \mu$.

**d) Détermination des « grandeurs moyennes »
 correspondant aux autres périodes de l'évolution
 de la culture.**

Afin de suivre les variations de cette « grandeur moyenne » au cours de l'évolution de la culture, nous avons effectué des prélèvements, dans la culture en bouillon, maintenue à l'étuve à 37°C ., aux heures suivantes :

1^{re} heure, 2^e heure, 3^e heure, 4^e heure, 5^e heure, 6^e heure, 7^e heure, 8^e heure, 10^e heure, 12^e heure, 24^e heure, 30^e heure, 48^e heure consécutives à l'ensemencement.

Chaque prélèvement a été fait en observant très exactement les détails donnés ci-dessus et, pour chaque période d'observation, nous avons dressé un tableau indiquant :

- 1^o le nombre total des germes mesurés ;
- 2^o la taille, exprimée en μ , de chacun de ces germes ;

3° le pourcentage des germes correspondant à chaque taille.

A l'aide de ces tableaux nous avons déterminé la « grandeur moyenne » correspondant à chaque période déterminée en observant la règle suivante :

Lorsque, dans un tableau, le pourcentage le plus élevé était nettement supérieur aux pourcentages des autres longueurs observées, nous avons pris comme « grandeur moyenne » la taille correspondant à ce pourcentage maximum.

Au contraire, lorsque dans un tableau, les plus fréquentes longueurs observées correspondaient à des pourcentages voisins, nous avons choisi pour « grandeur moyenne » la moyenne arithmétique de ces longueurs.

C'est ce qui s'est produit, par exemple, dans le cas du prélèvement de 4^e heure de l'expérience n° 1, nous avons alors :

23,13 %	de germes de	1 μ 5
28,72 %	—	2 μ
21,27 %	—	2 μ 5

La « grandeur moyenne » choisie a été $\frac{1,5 + 2 + 2,5}{3} = 2\mu$

e) Résultats numériques.

Il serait fastidieux de reproduire ici les nombreux tableaux ayant servi à la détermination de la « grandeur moyenne » des germes, à chaque prélèvement d'une même expérience, et ceci pour chacune des trois expériences effectuées. Nous nous bornerons donc à donner les valeurs obtenues dans chacun de ces essais, représentant la « grandeur moyenne » des bacilles à chaque période considérée de leur développement. Les variations de ces valeurs au cours d'une même expérience nous ont permis d'établir les courbes reproduites pages 94 et 95 mettant en évidence les variations de la taille du *B. Coli* en fonction de l'âge des cultures.

Expérience I.

La « grandeur moyenne » des germes de la culture :

A l'heure 0	est égale à	2 μ 3
A la 1 ^{re} heure	—	2 μ 2
A la 2 ^e —	—	2 μ 8
A la 3 ^e —	—	2 μ 3
A la 4 ^e —	—	2 μ
A la 5 ^e —	—	1 μ 8
A la 6 ^e —	—	1 μ 5
A la 7 ^e —	—	1 μ 6
A la 8 ^e —	—	1 μ 8
A la 10 ^e —	—	2 μ 2
A la 12 ^e —	—	2 μ 2
A la 24 ^e —	—	2 μ 5
A la 30 ^e —	—	2 μ 2
A la 48 ^e —	—	2 μ 2

Ces résultats se trouvent résumés dans le tableau ci-dessous :

EXPÉRIENCE 1.

Heures	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	24	30	48
Taille exprimée en μ	2,3	2,2	2,8	2,3	2	1,8	1,5	1,6	1,8	2,2	2,2	2,5	2,2	2,2

Nous avons pour les autres essais :

EXPÉRIENCE 2.

Heures	0	1	2	3	4	5	6	8	10	24	30	48
Taille exprimée en μ	2,5	2,5	3,5	2,5	1,5	1,8	1,3	2	2,3	2,5	2,3	2,2

Résultats résumés dans le tableau ci-dessous :

EXPÉRIENCE 3.

Heures	0	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	24	30	48
Taille exprimée en μ	2,3	2,3	2,8	2,2	2	1,8	1,5	1,5	1,8	2	2	2,5	2,3	2,3

Nous allons maintenant exposer les observations que nous avons pu faire au cours de ces essais :

Nous avons constaté les faits suivants :

1° *Au départ.* — La majorité des germes dessinés avait une longueur comprise entre 2μ et 3μ . Toutefois, nous observions un pourcentage assez élevé de formes plus courtes (ex. : 10 % à $1\mu 5$) et aussi quelques formes longues, de 6 à 14μ , mais extrêmement rares. Les microbes étaient assez grêles et peu colorés.

2° *De 0 à 1 heure.* — La taille des microbes restait sensiblement la même qu'au départ, ce qui paraît correspondre, comme nous le verrons plus loin, à une certaine latence précédant le commencement de la multiplication. Dès la fin de la première heure on observait beaucoup de formes en voie de division.

3° *De 1 heure à 2 heures.* — On notait un accroissement très net de la taille. Il existait quelques formes très longues, mais leur proportion restait aussi minime que sur les lames correspondant à l'heure 0. Par contre, les microbes étaient nettement plus gros et très fortement colorés.

4° *A la 3^e heure,* les colibacilles apparaissaient extrêmement gros. Beaucoup étaient en voie de division ou récemment divisés. Le pourcentage le plus élevé accusait une légère diminution de la longueur type.

5° *A la 4^e heure,* le nombre des formes courtes dominait nettement. Les lames avaient, de ce fait, un aspect *caractéristique* qui nous paraît justifier le qualificatif de « point critique » donné par HENRICI à cette période de la poussée.

6° *Pendant les 5^e et 6^e heures,* la diminution de la taille s'accroissait légèrement (la longueur-type passait de 2μ à $1\mu 8$ puis à $1\mu 5$).

Notons, aux 4^e, 5^e et 6^e heures, la présence de formes « géantes » (de 30 à 60μ), mais correspondant à un pourcentage infime (de l'ordre de 0,10 %).

La grande majorité des *B. Coli* restait bien colorée ; les bacilles étaient plus gros qu'au départ, mais sensiblement moins épais qu'à la 3^e heure.

7^o Pendant les 7^e et 8^e heure, la longueur-type augmentait légèrement de taille.

8^o A la 10^e heure, l'accroissement de la taille était devenu très net et nous retrouvions la *taille originale* des cellules ayant servi à l'ensemencement (ex. heure 0 : $2\mu 3$; 10^e h. : $2\mu 2$).

9^o Entre la 10^e et 12^e heure, les variations de taille étaient insignifiantes.

10^o Entre la 12^e et la 24^e heure, on observait un très léger accroissement dans la longueur-type des cellules qui passe de $2\mu 2$ à $2\mu 5$.

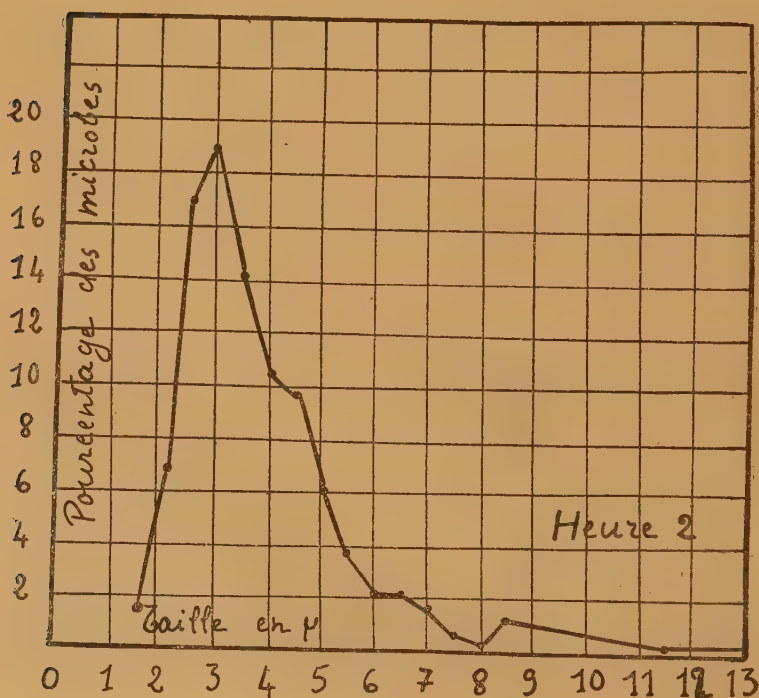
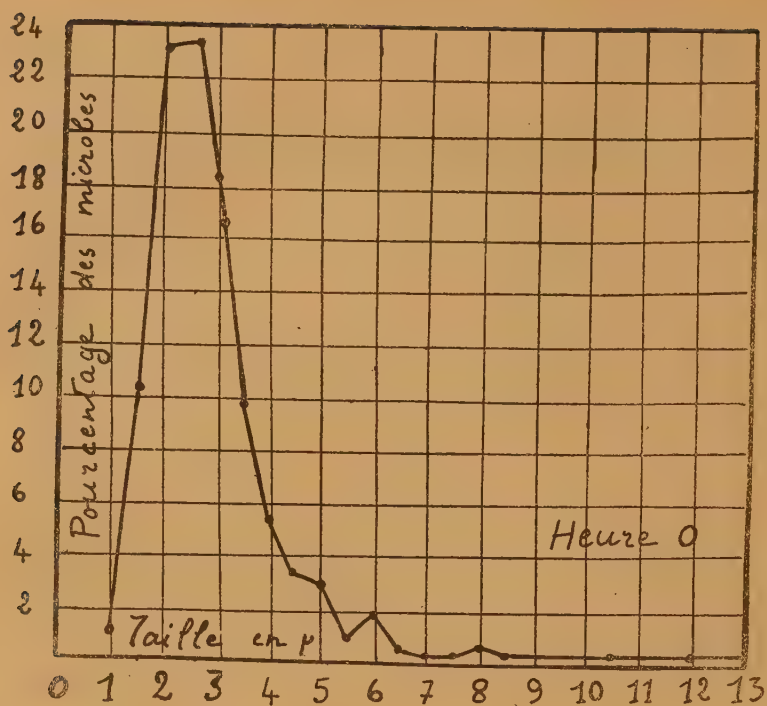
11^o Entre la 24^e et la 30^e heure, nous retrouvions une légère diminution de longueur pour la majorité des germes.

12^o Entre la 30^e et la 48^e heure, il ne se produisait aucune variation. Les *B. Coli* correspondant à toute la période d'observation comprise entre la 24^e et la 48^e heure étaient toujours nets, mais un peu moins colorés.

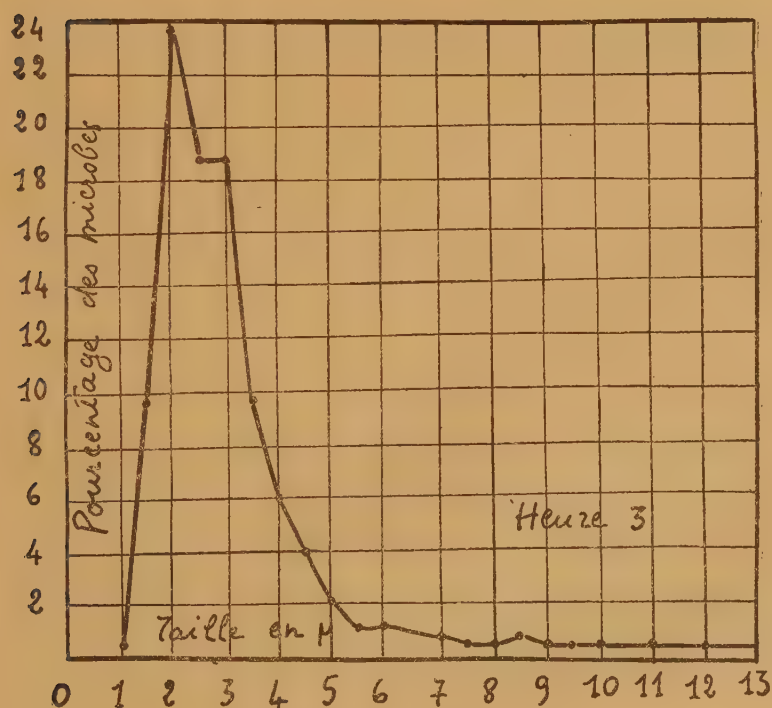
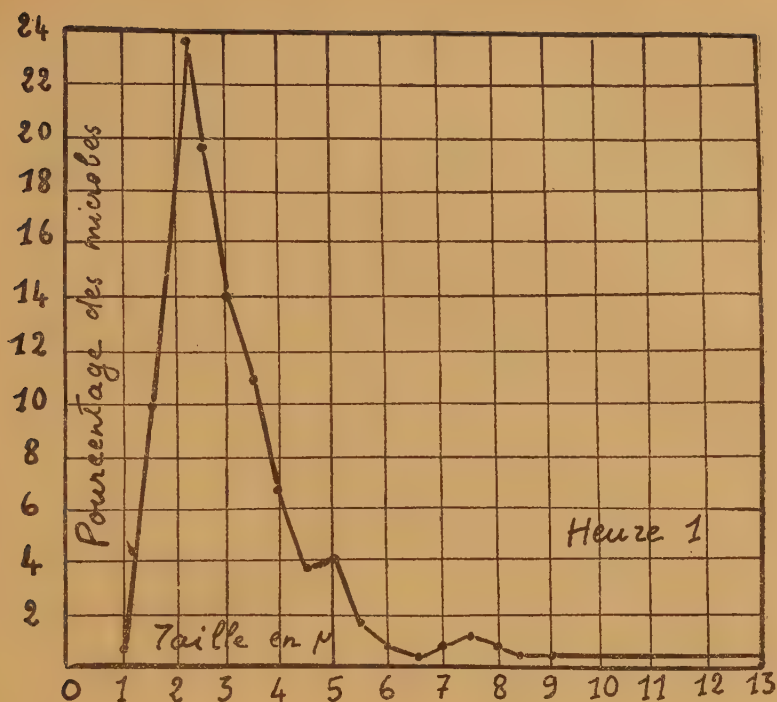
13^o Au 3^e jour, nous rencontrons des formes d'invololution, asymétriques, très mal colorées et ne se prêtant pas à la mensuration.

**f) Courbes traduisant les variations de longueur
du Colibacille, en fonction de l'âge de la culture.**

Nous avons pensé, tout d'abord, à présenter nos résultats en reproduisant graphiquement l'ensemble des variations de longueur observées, à chaque période considérée, au cours de l'évolution de la culture, en portant sur l'axe des abscisses la longueur des bactéries exprimée en μ , et, sur l'axe des ordonnées, les pourcentages correspondant à chaque longueur observée. Nous donnons,



Courbes « en cloche » traduisant les variations de la taille du *B. Coli* au cours de sa multiplication.



Courbes « en cloche ».

à titre d'exemple, quatre courbes « en cloche » obtenues de cette façon et se rapportant aux 4 premiers prélèvements effectués, dans l'essai n° 1.

Si nous avons renoncé à reproduire toute la gamme de ces courbes « en cloche », c'est parce que, comme nous l'avons indiqué plus haut, notre objectif essentiel est de mettre en évidence *les variations de la longueur moyenne la plus fréquente à chaque moment de la multiplication microbienne*. A ce point de vue le rapprochement des diverses courbes « en cloche » se révèle beaucoup moins net que l'examen d'une courbe unique traduisant les variations d'une *longueur-type* au cours de la multiplication et déterminée comme nous l'avons indiqué plus haut.

En portant en ordonnées les longueurs-types et en abscisses les âges qui leur correspondent, nous avons les courbes des variations de taille reproduites p. 94 et 95 courbes que nous allons maintenant interpréter.

g) Interprétation des courbes traduisant les variations de taille du Colibacille au cours de la multiplication bactérienne.

L'examen de ces courbes permet de constater nettement les faits suivants :

1° Pendant l'heure qui suit l'ensemencement, la variation de taille est pratiquement nulle, comme le prouve l'horizontalité de la portion de la courbe qui représente cette période.

2° A la 2^e heure de la multiplication, la longueur moyenne type atteint son maximum.

3° Entre la 2^e et la 6^e heure, les variations qui se produisent sont orientées dans le sens d'une diminution de longueur ; cette diminution s'effectue sur un rythme *rapide et constant* comme en témoignent les points successifs de la courbe qui s'étagent presque en ligne droite et présentent un écart important entre le point culminant (2^e heure) et le point le plus bas (6^e heure).

4° Entre les 6^e, 8^e et 10^e heures, les variations observées sont plus faibles et orientées à nouveau vers une augmentation de taille. La taille originale est presque retrouvée vers la 10^e heure de la culture.

5° Après la 10^e heure et jusqu'à la fin de la période d'observation on n'observe aucune fluctuation importante de la taille. Cette stabilité relative se traduit pendant toute cette période par un tracé du graphique presque parallèle à l'axe des temps.

Si maintenant nous considérons les résultats de nos mesures, et si nous les rapprochons des résultats obtenus par les auteurs qui ont travaillé sur le même microbe (CLARK et RUEHL, HENRICI, JENSEN), nous constatons les faits suivants :

1° L'accroissement net de la taille du colibacille que nous avons observé, au cours des deux premières heures qui suivent l'ensemencement du bouillon, confirme les résultats obtenus précédemment par CLARK et RUEHL, ainsi que les observations ultérieures d'HENRICI et de JENSEN.

D'après CLARK et RUEHL, l'accroissement de taille qui se produit pendant les premières heures d'évolution de la culture se retrouverait pour la plupart des espèces bactériennes. Toutefois, certains bacilles, tels que le bacille de la morve, de la diphtérie, le bacille d'HOFFMANN et le *bacillus Xerocis* feraient exception et présenteraient plutôt une légère diminution de taille au début du développement des cultures.

JENSEN a noté, de même, pour le *B. Coli*, à partir de la demi-heure qui suit l'ensemencement, un accroissement de grandeur, et la transformation de ce qu'il appelle les « petites formes de croissance » observées au départ, en « grandes formes de croissance ».

2° Bien que nous nous soyons préoccupée des variations de la *taille*, nous avons noté, à la 3^e heure, une augmenta-

tion de largeur très nette des bacilles, comme l'avait observé HENRICI.

3° Nos courbes qui traduisent les variations de la taille moyenne du Colibacille en fonction de l'âge de ce germe indiquent, entre la 3^e et la 6^e heure de la culture, une *diminution progressive* de cette taille.

De même JENSEN a signalé l'apparition, à *partir de la 4^e heure*, de « petites formes » parmi des « grandes formes » encore en majorité ; et à partir de la 5^e heure il a noté une *diminution nette* de la taille, fait confirmé par HENRICI.

4° Notons enfin que les « formes géantes » (30 à 60 μ) que nous avons trouvées dans les cultures à la 4^e, 5^e et 6^e heure de leur évolution, semblent correspondre aux « ombres bactériennes » signalées par JENSEN entre 3 h. 1/2 et 4 h. 1/2 après l'ensemencement, c'est-à-dire sensiblement pendant la même période.

Ces diverses considérations nous permettent donc d'affirmer un parfait accord de nos résultats avec ceux des auteurs qui nous ont précédée.

h) Rapprochement de la courbe des variations de la taille du B. Coli avec la courbe de multiplication de ce germe.

Nous allons maintenant essayer de coordonner les résultats obtenus, en étudiant, d'une part les variations du nombre des germes en fonction de l'âge de la culture et, d'autre part, les variations de grandeur de ces germes dans le même temps, et voir s'il n'est pas possible de les rattacher à un même phénomène général de l'évolution bactérienne.

En vue d'établir un parallèle entre la courbe obtenue précédemment dans l'étude des variations de la taille du Colibacille et une courbe de multiplication résultant de la numération de tous les germes visibles (les deux mesures ayant été faites sur des lames préparées dans des conditions

identiques, comme nous l'avons noté plus haut), nous avons représenté sur un même graphique (voir p. 94), d'une part la courbe de multiplication, traduisant les résultats de l'expérience 6, et d'autre part une courbe traduisant les variations de longueur du même bacille au cours de l'évolution de la culture (exp. I).

Nous allons voir que la courbe des variations de longueur nous conduit aux mêmes observations, qui ont déjà été faites au sujet de la multiplication du Colibacille.

En effet :

1° L'allongement de taille observé entre l'heure 0 et la 2^e heure consécutive à l'ensemencement semble correspondre à une division cellulaire faible pendant cette période. Ce fait, noté par l'examen morphologique direct, est traduit tout aussi nettement sur la courbe de multiplication, par l'augmentation peu importante du nombre des germes au cours de cette même période.

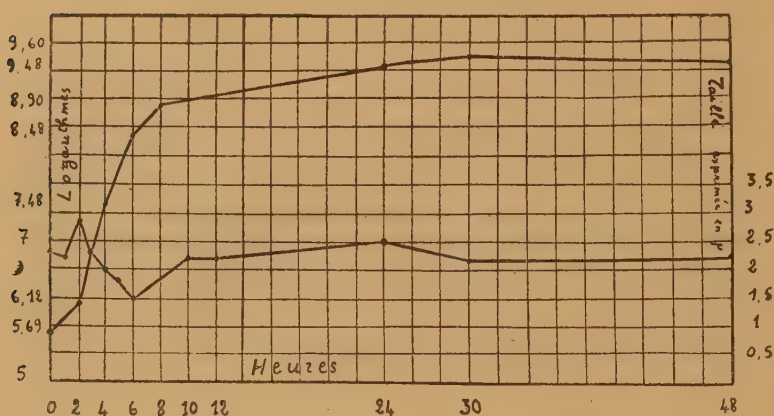
2° La prédominance des formes *courtes* entre la 2^e et la 6^e heure de la culture peut être considérée comme le résultat d'une division extrêmement active ; elle semble donc caractériser la période logarithmique sur la courbe des variations de longueur, comme l'élévation très forte du nombre des germes la caractérise sur la courbe de multiplication.

3° Entre la 6^e et la 8^e heure de la culture, la courbe traduisant les variations de longueur permet d'envisager un léger ralentissement de la division cellulaire, traduit par une faible augmentation de la taille moyenne type des bactéries, qui semblent ainsi avoir disposé de plus de temps pour s'allonger avant de subir une nouvelle scission.

L'examen de la courbe de multiplication pendant la même période confirme ce point de vue en montrant un accroissement du nombre des germes encore très marqué, mais cependant moins net que celui se produisant dans les intervalles compris entre la 2^e, la 4^e et la 6^e heure de la

culture, soit un ralentissement de la multiplication entre la 6^e et la 8^e heure.

4° La fin de la période de multiplication géométrique semble enfin marquée également par un allongement rapide des éléments microbiens, après la 8^e heure. A partir de la 10^e heure, la taille originale est sensiblement retrouvée et

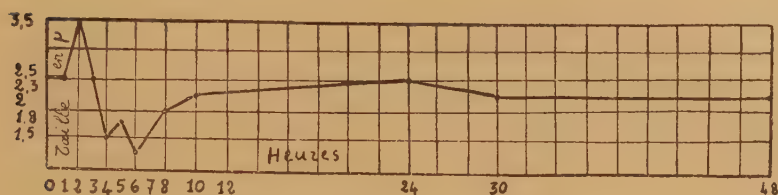


Courbe des variations de la taille : expérience I
et courbe de multiplication microbienne (exp. 6, v. Ch. I).

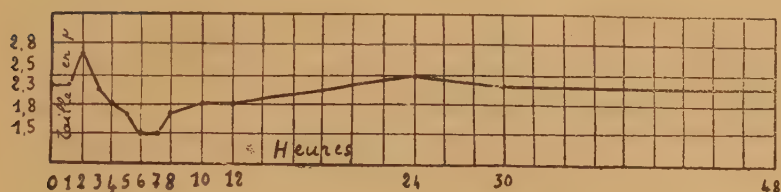
le peu d'intensité des fluctuations qui se produisent ensuite semble correspondre à une phase de multiplication pendant laquelle le nombre des germes se maintient à peu près constant.

Sur ce point le rapprochement de la courbe de numération des germes et de la courbe représentant les variations de grandeur vient donc confirmer le fait déjà observé par HENRICI, à savoir que lorsque la culture atteint la phase de repos, les cellules bactériennes ont retrouvé leur taille originale et les variations ultérieures sont insignifiantes. Nous pouvons conclure de cette série d'observations que, en définitive, les deux courbes de la variation de taille des bactéries en fonction de l'âge de la culture et de la variation du nombre des germes en fonction du même

facteur, apparaissent comme la traduction identique, mais sur des plans différents, d'un même phénomène que nous appellerons, à défaut d'un qualificatif plus précis, la « vitalité » de la culture (1).



Courbe des variations de la taille : expérience II.



Courbe des variations de la taille : expérience III.

i) Formes longues du Colibacille.

Nous avons noté, au cours de l'examen morphologique du Colibacille, la présence de formes longues, allant de 5 à 15 μ et souvent davantage (27 et même 36 μ dans une expérience). Ces formes étaient nettes, régulièrement colorées, et ne rappelaient en rien les organismes, dits d'« involution », rencontrés seulement dans les cultures après la 30^e heure. HENRICI, qui a également observé l'apparition régulière de ces formes anormalement longues, a tenté d'expliquer la présence de ces formes « géantes », tout au moins au cours de la période logarithmique, en suppo-

(1) Nous pouvons reproduire ici l'observation faite à propos du terme « germes vivants » adopté par certains auteurs. Ici encore « vitalité » doit s'entendre dans le sens de vigueur ou force appliquée spécialement à la faculté reproductive des bactéries.

sant que pendant cette phase la synthèse du protoplasme se produit beaucoup plus rapidement que le mécanisme de division cellulaire, d'où résulte un allongement exagéré de certains éléments microbiens.

Cet allongement est, d'après HENRICI, disproportionné avec les nécessités de la division cellulaire. L'auteur anglais l'explique dans les termes suivants :

« Les cellules poussant activement sont fondamentalement différentes des cellules au repos ; nous avons donc dans une culture jeune un type morphologique spécial, qui diffère autant du type standard que les cellules dites d'« involution » rencontrées dans les vieilles cultures ».

Ce dernier point paraît en accord avec ce que nous savons au sujet de l'évolution de la multiplication et de la morphologie bactériennes. Cependant, en ce qui concerne l'origine des formes « géantes » du Colibacille, nous croyons utile de faire les réserves suivantes :

1^o La présence de quelques-unes de ces formes extraordinairement longues au moment même de l'ensemencement, ne semble pas nous permettre de rejeter absolument l'hypothèse que ce soit d'elles que dérivent quelques-unes des formes géantes ultérieurement observées.

2^o Il paraît, d'autre part, difficile d'affirmer que ces aspects ne correspondent pas tout simplement à des « chaînes » de bacilles dont la division n'apparaît pas au microscope. Nous avons rencontré en particulier certaines formes (*B. Coli* de taille moyenne semblant se détacher d'une forme longue, des formes longues présentant des étranglements les divisant en 3 ou 4 parties égales de longueur moyenne), qui semblent autoriser cette conception.

En tout cas, et quelles que soient l'origine et la signification réelles des formes « géantes » du Colibacille, leur pourcentage *extrêmement faible* à tous les moments de la multiplication ne permet pas de leur attribuer une importance particulière dans l'étude du phénomène de « vitalité » en fonction de l'âge, seul point qui nous intéresse ici.

CHAPITRE III

Etude de la variation de la résistance des germes au cours du développement de la culture.

Avant d'aborder le détail de nos expériences sur la variation de la résistance du Colibacille au cours du développement de la culture, nous rappellerons brièvement les conclusions de quelques auteurs qui se sont plus particulièrement intéressés à ce problème :

Dès 1923, les bactériologistes J. M. SHERMAN et W. R. ALBUS [59 bis] avaient signalé que la résistance des germes variait sensiblement suivant l'âge des cultures auxquelles ils appartenaient. Ces auteurs observèrent en particulier que les bactéries « jeunes », appartenant à des cultures âgées de 3 h. 1/2 à 4 h. 1/2, étaient *plus sensibles* à l'action de l'eau distillée à 2° c., du ClNa à 2 %, de la température de 50 à 53° c. et du phénol à 0,5 %, que les bactéries des cultures âgées de 22 heures à 12 jours. Ces dernières, par contre, étaient plus sensibles que les cultures jeunes vis-à-vis de l'agglutination acide.

Plus récemment, M. M. WALKER et C. E. A. WINSLOW, puis M. M. WALKER, C. E. A. WINSLOW, E. V. MUNSINGTON et M. GRACE MOONEY [65] (1934), ont mesuré la production du gaz carbonique et du gaz ammoniac dans des cultures de *B. Coli* effectuées, soit en eau peptonée (1 % de peptone), soit en milieu peptone-glucose (0,5 % de glucose et 1 % de peptone), avec ou sans aération des cultures. Ces derniers auteurs constatèrent que la production de gaz

variait notablement au fur et à mesure du vieillissement des cultures et que l'accroissement le plus marqué se produisait au cours de la troisième demi-heure qui suit l'ensemencement, dans le milieu de peptone aéré, et au cours de la quatrième demi-heure de culture dans le milieu de peptone non-aéré. Pour le milieu peptone-glucose aéré cet accroissement maximum était réparti de façon égale entre la troisième et la quatrième demi-heure, c'est-à-dire qu'il se manifestait vers la fin de la période de latence et tout au début de la période logarithmique.

Ces expériences mettent donc en évidence une activité métabolique particulièrement forte chez les bactéries « jeunes » et confirment ainsi les travaux d'auteurs tels que CLARK et RUEHL [14] (1919), SHERMAN et ALBUS [59 bis] (1923), HENRICI [28] (1928), MARTIN [39 bis] (1932), etc..., qui tous signalèrent la profonde différence existant entre la morphologie, la résistance et le métabolisme des germes d'âges différents.

ESSAIS PERSONNELS

Pour notre part, pour étudier les variations de la résistance de notre souche de Colibacille, au fur et à mesure de son développement dans un milieu de culture liquide, nous avons eu recours aux deux procédés suivants :

- A. — A l'établissement, pour chaque période considérée de la multiplication microbienne, du « rapport de vitalité » défini par l'expression :

$$\frac{\text{Nombre des germes capables de se reproduire après transport sur gélose}}{\text{Nombre des germes visibles par numération microscopique WRIGHT-FRIES}}$$

- B. — A l'étude de la résistance des germes, prélevés à différentes phases de la multiplication microbienne vis-à-vis de l'action antiseptique de l'iode.

**A. — Etude des variations du « Rapport de vitalité »
au cours du développement de la culture.**

Les résultats obtenus en suivant, en fonction du temps, l'évolution quantitative de la population microbienne dans une culture, nous ont permis d'établir, en accord avec HEHEWERTH [27], WILSON [66] et A. KAPLAN [32], que le nombre des germes capables de se reproduire après ensemencement sur plaques de gélose nutritive est toujours inférieur à celui des germes visibles par la méthode de numération microscopique WRIGHT-FRIES. Comme nous l'avons déjà signalé (voir chap. I, p. 50) un tel résultat n'a rien qui puisse nous surprendre; nous savons en effet que les germes éprouvent une difficulté plus grande à vivre sur un milieu solide dont les principes nutritifs sont moins facilement accessibles, et que les microbes capables, après transport sur gélose, de s'adapter à ces conditions de vie moins favorables, et de donner naissance à des colonies dans ce nouveau milieu, représentent sans doute les éléments les plus résistants de la culture.

Si donc nous comparons les résultats numériques obtenus par les deux méthodes de numération employées, c'est-à-dire les chiffres correspondant à la totalité des germes visibles de la culture (méthode WRIGHT-FRIES) et les chiffres exprimant le nombre des microbes « repiquables » existant dans le milieu, au même moment de l'évolution bactérienne, nous pouvons considérer que le rapport :

$$\frac{\text{Nombre des « germes repiquables »}}{\text{Totalité des germes visibles}},$$

correspond, en réalité, à une évaluation de la « vitalité microbienne » de la culture à la période considérée, *cette vitalité étant d'autant plus forte que la proportion des « germes résistants » est plus élevée.*

L'étude des variations de ce « Rapport de Vitalité » en fonction de l'âge des germes en expérience, a déjà été poursuivie par quelques auteurs, en particulier par HEHE-

WERTH et WILSON. Elle a été reprise par A. KAPLAN au cours de son travail sur le B. Pyocyanique.

Ces derniers résultats présentent un intérêt tout particulier pour nous, puisqu'ils ont été obtenus par l'emploi des mêmes procédés de numération, et dans des conditions expérimentales semblables aux nôtres. Nous rappelons donc que les principaux points établis à ce sujet par M^{me} A. KAPLAN sont les suivants :

Le « rapport de vitalité », c'est-à-dire le rapport :

Nombre des microbes « résistants » ou capable de se reproduire sur gélose,
Totalité des microbes visibles par numération WRIGHT-FRIES

décroît nettement au début de la multiplication, entre l'heure 0 de l'ensemencement et la 2^e heure de la culture. Il se relève ensuite rapidement, pour atteindre son maximum vers la 8^e heure ou la 10^e heure, puis décroît de nouveau plus lentement pour retrouver vers la 24^e heure une valeur voisine, bien qu'inférieure, à sa valeur au départ.

Pour notre part, nous avons repris ces essais, en utilisant comme germes des colibacilles provenant d'une souche âgée de 24 heures, incubée à 37° c. Ces microbes étaient ensemencés dans 100 cm³ de bouillon simple peptoné, salé, à raison de 500.000 germes par centimètre cube de milieu. Les numérations ont été effectuées à partir de la culture en bouillon, sur des prélèvements effectués au moment de l'ensemencement, puis après 2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures, 24 heures, 30 heures et 48 heures d'incubation de cette culture à l'étuve à 37° c. Pour ces numérations, nous avons utilisé simultanément la méthode dite « des plaques de gélose » nous donnant le nombre des germes résistants ou « repiquables », et la méthode microscopique de WRIGHT-FRIES, nous donnant la totalité des germes visibles existant dans la culture à la même période de son évolution. Les chiffres fournis par l'application de chacune de ces deux méthodes (voir chap. I, p. 42 et suivantes) nous ont permis d'établir, en ce qui concerne les variations du « rapport de vitalité », la série de résultats suivante :

EXPÉRIENCE 4.

Valeur de l'ensemencement : 500.000 germes par centimètre cube.

Heure 0 :

Nombre des « germes repiquables » ou capables de se reproduire après ensemencement sur plaques de gélose	170.000 par cm ³
Nombre des germes visibles par numération WRIGHT-FRIES.....	500.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{170.000}{500.000}$	0,34

2^e heure :

Nombre des « germes repiquables » ...	140.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	1.030.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{140.000}{1.030.000}$	0,13

4^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	3.500.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	6.950.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{3.500.000}{6.950.000}$	0,50

6^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	120.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	231.410.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{120.000.000}{231.410.000}$...	0,51

8^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	401.680.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	405.000.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{401.500.000}{405.000.000}$...	0,99 $\neq$ 1

24^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	2.100.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	8.553.100.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{2.100.000.000}{8.553.100.000}$..	0,24

30^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	3.650.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	6.016.500.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{3.650.000.000}{6.016.500.000}$..	0,60

48^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	2.200.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	5.724.900.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{2.200.000.000}{5.724.900.000}$..	0,38

EXPÉRIENCE 5.

Valeur de l'ensemencement : 500.000 germes par centimètre cube.

Heure 0 :

Nombre des « germes repiquables » ou capables de se reproduire après ensemencement sur gélose	365.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles par numération WRIGHT-FRIES	500.000.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{365.000.000}{500.000.000}$	0,73

2^e heure :

Nombre des « germes repiquables »....	240.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	1.760.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{240.000}{1.760.000}$	0,13

4^e heure :

Nombre des « germes repiquables »....	4.700.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	29.640.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{4.700.000}{29.640.000}$	0,16

6^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	120.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	283.700.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{120.000.000}{283.700.000}$	0,42

8^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	885.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	1.010.000.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{885.000.000}{1.010.000.000}$.	0,87

24^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	2.550.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	8.585.200.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{2.550.000.000}{8.585.200.000}$.	0,29

30^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	1.150.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	7.357.300.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{1.150.000.000}{7.357.300.000}$.	0,15

48^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	1.600.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	5.222.600.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{1.600.000.000}{5.222.600.000}$.	0,30

EXPÉRIENCE 7.

Valeur de l'ensemencement : 500.000 germes par centimètre cube.

Heure 0 :

Nombre des « germes repiquables » ou capables de se reproduire sur gélose . . .	125.000 par cm ³
Nombre des germes visibles par numération WRIGHT-FRIES	500.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{125.000}{500.000}$	0,25

2^e heure :

Nombre des « germes repiquables » . . .	135.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	1.310.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{135.000}{1.310.000}$	0,10

4^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	4.372.500 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	15.770.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{4.372.500}{15.770.000}$	0,27

6^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	102.500.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	226.560.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{102.500.000}{226.560.000}$	0,45

8^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	280.500.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	419.880.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{280.500.000}{419.880.000}$	0,66

24^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	715.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	2.004.700.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{715.000.000}{2.004.700.000}$..	0,35

30^e heure :

Nombre des « germes repiquables »...	467.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	1.680.000.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{467.000.000}{1.680.000.000}$..	0,27

EXPÉRIENCE 9.

Valeur de l'ensemencement : 500.000 germes par centimètre cube.

Heure 0 :

Nombre des « germes repiquables » ou capables de se reproduire sur gélose.....	125.000 par cm ³
Nombre des germes visibles par numération WRIGHT-FRIES.....	500.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{125.000}{500.000}$	0,25

2^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».....	105.000 par cm ³
Nombre des « germes visibles ».....	1.960.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{105.000}{1.960.000}$	0,04

4^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».....	1.575.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	61.110.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{1.575.000}{61.110.000}$	0,025

6^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	306.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles	1.110.700.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{306.000.000}{1.110.700.000}$..	0,27

8^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	810.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	1.865.260.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{810.000.000}{1.865.260.000}$..	0,40

24^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	960.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	3.599.500.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{960.000.000}{3.599.500.000}$..	0,26

30^e heure :

Nombre des « germes repiquables ».	880.000.000 par cm ³
Nombre des germes visibles.....	2.885.600.000 par cm ³
Rapport de vitalité $\frac{880.000.000}{2.885.600.000}$..	0,30

On trouvera réunis dans le tableau suivant (tableau p. 106) les résultats obtenus au cours de ces différents essais :

Expérience 4		Expérience 5		Expérience 7		Expérience 9	
Hres	Rapport	Hres	Rapport	Hres	Rapport	Hres	Rapport
0	0,34	0	0,73	0	0,25	0	0,25
2	0,13	2	0,13	2	0,10	2	0,04
4	0,50	4	0,16	4	0,27	4	0,025
6	0,51	6	0,42	6	0,45	6	0,27
8	1 (max.)	8	0,87 (max.)	8	0,66 (max.)	8	0,40 (max.)
24	0,24	24	0,29	24	0,35	24	0,26
30	0,60	30	0,15	30	0,27	30	0,30
48	0,38	48	0,30				

Observations concernant les résultats précédents.

L'examen de ce tableau nous permet de constater les faits suivants :

1° Les chiffres exprimant le « rapport de vitalité » sont toujours, comme il fallait s'y attendre, *inférieurs à l'unité*. Dans un cas cependant (expérience 4, 8^e heure), ce rapport s'est trouvé extrêmement voisin de l'unité, c'est-à-dire que presque tous les germes de la culture, dénombrés par la méthode de WRIGHT-FRIES, se sont révélés capables de donner naissance à des colonies après transport sur gélose nutritive, ce qui traduit évidemment une vitalité particulièrement forte de la culture à cette phase de la multiplication microbienne.

2° Les valeurs des « rapports de vitalité » présentent, d'une expérience à l'autre, des variations notables et qu'il nous a été impossible d'interpréter. Si nous prenons par exemple les chiffres fournis par une culture âgée de 4 heures, nous trouvons :

expérience 4	0,50
— 5	0,16
— 7	0,27

et pour une culture âgée de 30 heures :

expérience 4	0,60
— 5.....	0,15
— 7.....	0,27

Des écarts semblables ont d'ailleurs été constatés dans le travail effectué précédemment par M^{me} A. KAPLAN sur le B. Pyocyanique.

Les résultats les plus constants nous ont été fournis par les « Rapports de vitalité » déterminés dès l'ensemencement du milieu et par ceux correspondant aux prélèvements de la 2^e heure, comme il est facile de s'en rendre compte par l'examen du tableau reproduit ci-dessus.

3^o Nous avons toujours constaté, entre l'heure 0 et la 2^e heure de la culture, une *diminution* du « rapport de vitalité » correspondant sans doute à la difficulté qu'éprouvent les germes nouvellement formés dans la culture, à se reproduire après transport sur gélose.

4^o Dans toutes nos expériences le maximum du « rapport de vitalité » a été atteint à la 8^e heure de la multiplication, ce qui semble correspondre à un maximum de résistance des cultures âgées de 8 heures.

5^o La vitalité des germes âgés de 24 heures s'est montrée, le plus souvent, voisine de la vitalité des germes ayant servi à l'ensemencement, comme en témoignent les résultats suivants :

EXPÉRIENCE 4.

Rapport de vitalité	au moment de l'ensemencement..	0,34
— —	après 24 heures de culture.....	0,24

EXPÉRIENCE 7.

Rapport de vitalité	au moment de l'ensemencement..	0,25
— —	après 24 heures de culture.....	0,35

EXPÉRIENCE 9.

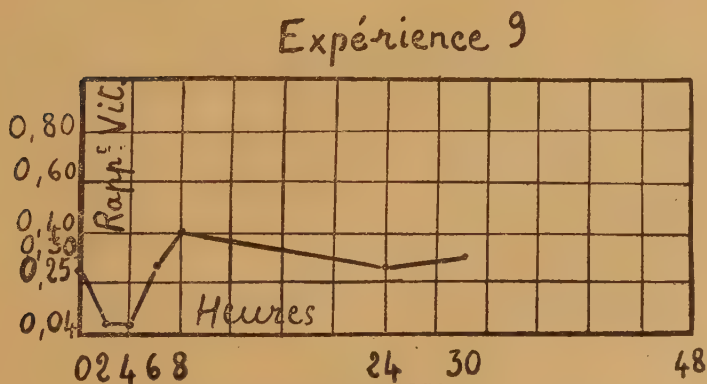
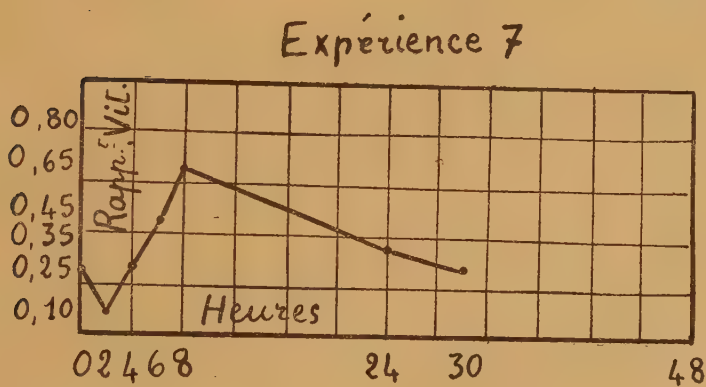
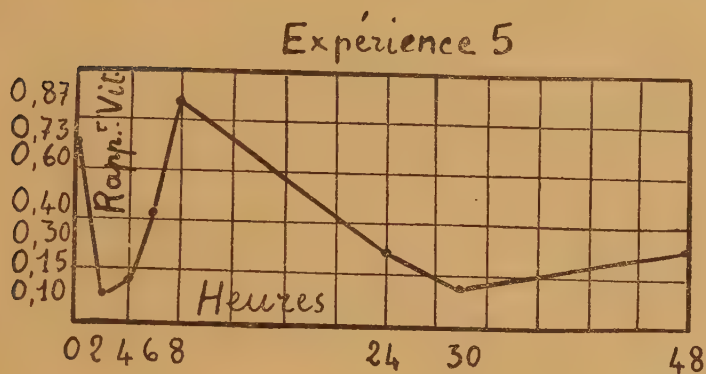
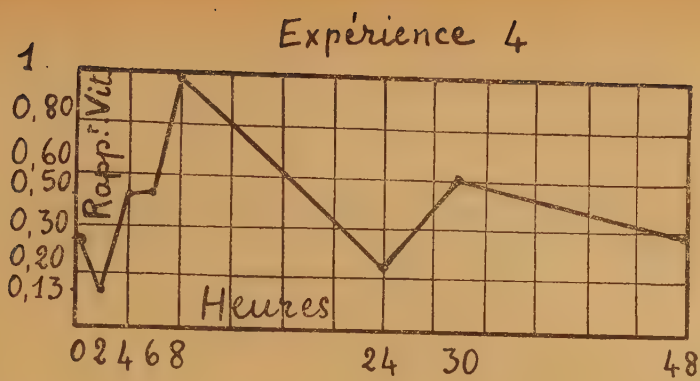
Rapport de vitalité	au moment de l'ensemencement..	0,25
— —	après 24 heures de culture.....	0,26

*Courbes représentant les variations du « Rapport de vitalité »
en fonction de l'âge de la culture :*

A l'aide des précédents résultats, nous avons établi des courbes reproduisant les variations du « Rapport de vitalité » en fonction de l'âge de la culture. Pour ceci, nous avons porté en abscisses les heures auxquelles les prélèvements ont été effectués dans la culture en expérience, et sur l'axe des ordonnées les valeurs correspondantes des « Rapports de vitalité » déterminés à ces mêmes heures. Ces courbes (voir p. 109) traduisent donc graphiquement les variations de ce « Rapport de vitalité » au cours des diverses phases de la multiplication microbienne.

L'examen de ces courbes permet de constater que la « vigueur » des germes semble *diminuer* pendant la période qui suit immédiatement l'ensemencement, puis se *relève et croît rapidement* pendant la période qui s'étend de la 2^e à la 8^e heure de la culture. Cette 8^e heure qui coïncide avec la fin de la période logarithmique correspond au *maximum* du « rapport de vitalité ». A partir de la 8^e heure, la vitalité microbienne *décroît* constamment jusqu'à la 24^e heure, où la valeur du « Rapport de vitalité » est très souvent voisine de la valeur de ce rapport au départ. Entre la 24^e et la 30^e heure les variations du « Rapport de vitalité » sont en général *faibles* et les courbes traduisant les résultats numériques obtenus, entre la 24^e heure de la culture et la fin de la période d'observation, ont tendance à décrire une sorte de palier.

Nous ne nous étendrons pas davantage sur ces observations, car nous nous réservons d'y revenir à la fin de notre travail lorsque nous aurons tous les éléments nous permettant d'effectuer un rapprochement entre ces variations du « Rapport de vitalité » au cours de l'évolution de la culture et les variations concomitantes de la morphologie et de la résistance à un antiseptique, du même germe, rapprochement qui nous permettra une vue générale sur l'évolution de la résistance des germes en fonction de l'âge des cultures.



Courbes des variations du « Rapport de vitalité ».

B. — Etude de la résistance des germes, prélevés à différentes phases de la multiplication microbienne, à l'action antiseptique de l'iode.

I. — *Choix de la méthode.*

Pour étudier la résistance du Colibacille, à différents stades de son développement, à l'action d'une substance antiseptique, nous nous sommes adressée à la technique décrite par M. RÉGNIER et M^{lle} LAMBIN, et dont la mise au point détaillée est exposée dans la thèse de S. LAMBIN [35 bis].

Cette technique appartient au groupe des méthodes dites « des suspensions », dont le principe consiste à mettre en contact, au sein d'un liquide de suspension, d'une part, la substance dont on veut déterminer l'action désinfectante et, d'autre part, les germes en expérience ; après un certain temps de contact, une fraction du mélange est transportée dans un milieu de subculture approprié, permettant d'observer si les germes ainsi traités ont conservé, ou non, la faculté de se développer.

Le principe de ces méthodes des « suspensions » s'oppose à celui des méthodes dites « des porte-germes », qui consiste à fixer sur des objets inertes tels que fils de soie, morceaux d'étoffe, billes de verre, etc., les microbes en expérience. Ces objets servant au transport des germes, d'où leur nom de « porte-germes », sont ensuite immergés, pendant un intervalle de temps déterminé, dans une solution désinfectante. Les « porte-germes » sont ensuite traités de façon à être débarrassés dans la mesure du possible, du désinfectant qu'ils pouvaient retenir, puis introduits dans un milieu de subculture convenable pour assurer le développement des germes non détruits.

Comme nous le verrons plus loin, pour effectuer l'étude de la résistance des germes en expérience à l'action d'un antiseptique donné et en fonction de l'âge de ces germes, nous devons :

- 1^o connaître avec exactitude le nombre des germes en expérience au début de l'essai de façon à pouvoir opérer, à chaque période déterminée de la multiplication, sur une *même quantité* de ces germes ;
- 2^o être assurée que les variations de résistance observées dépendent *entièrement* des deux facteurs variants, qu'il nous est permis de contrôler avec exactitude, c'est-à-dire d'une part, *l'âge* des germes en expérience et, d'autre part, le *titre* de la solution antiseptique à l'action de laquelle ces germes sont soumis.

Or, d'une part, les méthodes dites « des porte-germes » ne permettent pas de connaître, même approximativement, le nombre des microbes fixés et encore moins le nombre des microbes « retenus » par les objets inertes servant à leur transport ; d'autre part, les procédés préconisés par les auteurs pour réaliser l'opération extrêmement délicate de la fixation préalable des germes sur ces objets, sont susceptibles d'*altérer*, dès le début de l'expérience, la vitalité microbienne, en sorte que ce sont des germes dont la résistance est déjà diminuée dans des proportions impossibles à apprécier, qui sont ensuite soumis à l'action du désinfectant. :

Les méthodes dites « des suspensions » réalisent au contraire, comme nous allons le voir, les conditions nécessaires pour nous permettre de suivre commodément les variations de la résistance des germes à un antiseptique donné en fonction de l'âge de la culture en expérience. Nous allons exposer la technique générale suivie par S. LAMBIN dans ses recherches sur « l'activité antimicrobienne des substances chimiques », puis nous indiquerons les modifications que nous avons apportées à cette technique pour l'adapter à nos propres essais.

II. — *Exposé général de la technique servant à la détermination du « Pouvoir antibiotique » d'une substance antiseptique et des modifications apportées à cette technique pour l'adapter à nos propres essais.*

On appelle « Pouvoir antibiotique » d'une substance antiseptique la faculté que possède cette substance de *détruire définitivement* les germes dans un milieu donné, de telle sorte qu'ils ne puissent plus se développer ultérieurement dans un milieu où se trouvent réalisées les conditions optima de développement pour ces mêmes germes.

Le « Pouvoir antibiotique » d'une substance est mesuré par la valeur de la « dose antibiotique », c'est-à-dire par *la plus petite quantité de cette substance qui est nécessaire et suffisante pour tuer, pendant un intervalle de temps donné, le nombre des germes en expérience.*

La « dose antibiotique » est exprimée, en *grammes*, par la plus petite quantité de la substance qu'il suffit d'ajouter à un *litre* d'un milieu déterminé pour tuer, *en un temps donné* une quantité *connue* de germes, elle est d'autant plus petite que le pouvoir antibiotique est plus grand et inversement.

a) La technique consiste en principe à faire agir, pendant un temps donné, sur une quantité *connue* et *invariable* de germes, des quantités *progressivement croissantes* de la substance antiseptique choisie, puis à vérifier la survie des germes ainsi traités. Le temps de contact des germes avec l'antiseptique, dans le cas des microbes non sporulés, est de 15 minutes. La concentration de l'émulsion bactérienne mise en expérience est de 500 millions de germes par centimètre cube.

b) Les subcultures destinées à rechercher la survie ou la mort des germes traités par l'antiseptique sont effectuées en ensemençant $1/10^e$ de cm^3 du milieu, dans lequel

s'est effectué le contact des germes et de l'antiseptique, dans 5 cm³ de bouillon peptoné salé (1).

Avant d'aborder le détail de nos propres essais portant sur l'étude des variations de l'action antibiotique exercée par une solution iodo-iodurée sur des germes de *Bacille Coli* pris à des âges différents, nous allons signaler les modifications que nous avons introduites dans la technique précédente et le pourquoi de ces modifications.

1. Modification portant sur le nombre des germes en expérience.

Comme nous l'avons déjà indiqué précédemment, le but poursuivi dans cette troisième série d'expériences était de suivre les variations de la résistance du *B. Coli*, à l'action d'un antiseptique choisi, en fonction de l'âge de la culture. Pour que les résultats de cette étude puissent être utilement comparés à ceux des expériences précédentes concernant les variations du nombre et de la taille du même microbe, il importait nécessairement que les conditions expérimentales de cette nouvelle série d'essais soient *aussi voisines que possible* des conditions observées précédemment, ce qui nous a conduit en particulier à conserver la même valeur d'ensemencement initial du milieu de culture, c'est-à-dire 500.000 germes par centimètre cube.

La première détermination d'activité antibiotique de la solution iodo-iodurée vis-à-vis d'une culture de *B. Coli* (ensemencée à raison de 500.000 germes par cm³), était effectuée sur cette culture âgée de 2 heures ; la concentration en germes du milieu à cette période était environ de 2 à 3 millions par centimètre cube. C'est donc cette concentration (déterminée exactement dans chaque expérience par notre technique habituelle de numération

(1) Le choix de ce très petit volume de 1/10 de cm³ répond, dans la technique, à l'objection faite généralement aux méthodes des « suspensions », et d'après laquelle l'antiseptique, entraîné en même temps que les germes traités dans le milieu de subculture, était susceptible d'entraver le développement ultérieur de ces germes.

WRIGHT-FRIES), que nous avons adoptée, pour tous les essais ultérieurs.

2. Modification portant sur la composition du milieu de culture.

Pour les mêmes raisons, et bien que nous sachions le bouillon de viande peptoné salé moins favorable, en raison des albumines qu'il contient, à la mesure de l'activité antibiotique d'une substance chimique, nous avons conservé ce milieu dans toutes nos expériences.

Il est bien entendu que ces modifications étant susceptibles de compromettre la valeur absolue des résultats obtenus, considérés du seul point de vue de la détermination de la « dose antibiotique », nous n'avons, en aucun cas, voulu présenter le chiffre se rapportant à cette dose comme ayant une signification propre. Tous les résultats numériques se rapportant à cette dernière série d'essais doivent donc être considérés comme exprimant un *rapport*, celui de la plus ou moins grande résistance offerte à l'action antiseptique par les germes traités et cela en fonction de l'âge de la culture dans laquelle ces germes ont été prélevés.

3. Modification concernant le dénombrement des germes en expérience au cours d'un essai.

Pour suivre les variations de la résistance présentée par le Colibacille à un antiseptique donné, au fur et à mesure de l'évolution de la cultureensemencée au départ à raison de 500.000 germes par centimètre cube du milieu, nous avons utilisé des prélèvements effectués dans cette culture après :

2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures d'incubation à 37° c. Ces heures ont été choisies comme répondant aux périodes les plus intéressantes de l'évolution microbienne, comme l'ont prouvé les résultats acquis au cours des essais antérieurs, concernant les variations de la vitalité et les variations de la forme du même bacille.

Comme nous l'avons vu plus haut, le problème était de déterminer, pour chaque prélèvement, la dose d'antiseptique nécessaire et suffisante pour tuer, en 15 minutes, un nombre connu et *invariable* de germes, en faisant agir sur ces germes des quantités progressivement croissantes de la substance antiseptique choisie, puis en vérifiant la survie des microbes ainsi traités. La nécessité où nous étions d'opérer, pendant tout le cours d'un même essai, sur une quantité *fixe* de germes, nous obligea donc à effectuer une série de numérations préliminaires destinées à nous faire connaître le nombre des germes mis en expérience au *début* de la période d'observation, c'est-à-dire après la 2^e heure d'incubation de la culture ensemencée à raison de 500.000 germes par centimètre cube, puis *le nombre des germes* développés dans cette même culture après la 8^e, la 24^e et la 48^e heure, de façon à pouvoir calculer, pour ces trois derniers prélèvements, le chiffre des dilutions qui permettraient de mettre, pendant tout le cours de l'essai, un *même nombre de germes* en contact avec des quantités connues et croissantes de la solution antiseptique.

Nous opérons de la façon suivante, pour ces divers prélèvements :

α) PRÉLÈVEMENT DE LA 2^e HEURE.

Au moment du prélèvement de la 2^e heure nous mélangions dans un tube à essai stérile, muni de billes de verre, des volumes déterminés de la culture microbienne et d'une émulsion de levure titrée, et nous préparions des étalements sur lames en vue de la numération des germes, suivant la technique habituelle de numération microscopique indirecte de WRIGHT-FRIES. Cette numération, qui, en raison du temps qu'elle demande, ne peut être effectuée qu'*après* la série de manipulations exigées pour la détermination de la « dose antibiotique » à la 2^e heure, nous fixait cependant *a posteriori* sur le nombre des germes mis en œuvre à ce moment, ce nombre étant contenu, comme nous le verrons plus loin, dans 4 cm³ 5 de la culture en expérience.

β) PRÉLÈVEMENT DE LA 8^e HEURE.

Pendant la période logarithmique, le développement des germes était *beaucoup trop rapide* pour nous permettre d'effectuer, au moyen de la méthode WRIGHT-FRIES, une numération préalable nécessaire *pour calculer le volume de culture contenant le même nombre de germes que celui mis en expérience à la 2^e heure.*

Nous avons tout d'abord pensé à résoudre la difficulté en utilisant un procédé de numération basé sur la mesure de l'*opacité* du milieu de culture, procédé qui a l'avantage d'être d'exécution rapide. Il nous suffisait alors d'effectuer un prélèvement 7 h. 30 environ après l'ensemencement, et de comparer son opacité à celle d'un *témoin fixe* (par exemple à celle d'une culture de Colibacille de 24 heures, tuée par stérilisation et additionnée de formol). Le chiffre obtenu ainsi, rapproché d'une série de chiffres déterminés par la comparaison du même témoin fixe et d'une échelle correspondant à des cultures contenant des quantités croissantes et connues de germes, donnerait ainsi le titre cherché.

Malheureusement, nous nous sommes aperçue que nous n'obtenions pas une *concordance suffisante* entre les variations du chiffre d'opacité et les variations de la quantité des germes contenus dans les cultures examinées. Les nombreuses mesures d'opacimétrie effectuées près de nous au Laboratoire par J. LÉGER ont confirmé nos propres résultats sur ce point, et le fait ne paraît pas surprenant si on considère que l'opacité du milieu est due, non seulement à la quantité des germes qu'il contient, mais aussi aux éléments provenant de la destruction de ces germes, à leurs produits de sécrétions, aux précipitations diverses se produisant au cours de la multiplication microbienne, etc...

Nous avons donc renoncé à la mesure opacimétrique et nous avons tourné la difficulté *en nous reportant aux résultats numériques que nous avons obtenus au cours de nos expériences précédentes sur la multiplication du Colibacille*, expériences effectuées dans le même milieu, avec le même taux d'ensemencement et en utilisant le même procédé

de numération. Nous adoptions donc pour chiffre probable de la population microbienne dans la culture de 8^e heure, celui qui avait été obtenu dans une expérience de multiplication qui donnait, pour la 2^e heure, le chiffre *le plus voisin* de celui que nous venions de déterminer à la 2^e heure de l'essai en cours. Ce procédé nous a donné toute satisfaction et nous avons pu constater, qu'en raison de la forte multiplication du nombre des germes qui se produit au cours de la phase « logarithmique », les écarts même *notables* existant entre le chiffre *supposé* et le chiffre *réel* (déterminé ultérieurement à partir de lames préparées à la 8^e heure, par la méthode de numération de WRIGHT-FRIES), *n'entraînaient pas de variation sensible pour la valeur du prélèvement à effectuer.*

Considérons, à titre d'exemple, le cas de notre essai n° 1 dans lequel l'erreur inhérente à notre procédé a été *la plus forte*, nous verrons que, même dans ce cas extrême, le procédé de calcul employé pour établir le volume de culture à prélever, pour introduire dans l'essai le nombre de germes convenable, s'est montré d'une précision largement suffisante.

La numération microscopique effectuée à partir de la culture âgée de 2 heures nous avait donné 3.270.000 germes par centimètre cube.

En nous reportant aux résultats précédemment obtenus dans l'étude de la poussée, nous trouvions, pour l'expérience 8, les chiffres suivants :

2^e heure : 2.380.000 ;

8^e heure : 1.439.700.000.

Evidemment, l'écart existant entre les chiffres obtenus à la 2^e heure dans les 2 expériences était particulièrement sensible. Toutefois, nous avons pris, comme chiffre *probable* des germes existant dans le milieu à la 8^e heure, le chiffre de 1.440.000.000 de germes par centimètre cube, voisin du chiffre obtenu dans l'expérience 8.

Notre prise d'essai de 2^e heure était de 4 cm³ 5, le nombre des germes en expérience à ce moment était :

$$3.270.000 \times 4,5 = 14.715.000 \text{ germes.}$$

Pour obtenir le même chiffre à partir de la culture âgée de 8 heures, il fallait donc prélever :

$$\frac{1 \times 14.715.000}{1.440.000.000} = 0 \text{ cm}^3 010.$$

soit 1 cm³ d'une dilution 1/100^e.

Or la numération de contrôle, effectuée *a posteriori* par la méthode de WRIGHT-FRIES à partir d'un prélèvement de la culture âgée de 8 heures, nous a montré que le nombre de germes existant *réellement* dans le milieu de cette période était de :

1.253.000.000 germes par centimètre cube.

S'il nous avait été permis de connaître ce chiffre avant d'effectuer notre essai, nous aurions pris :

$$\frac{1 \times 14.715.000}{1.253.000.000} = 0 \text{ cm}^3 011.$$

soit *encore*, 1 cm³ d'une dilution à 1/100^e.

α) PRÉLÈVEMENTS DE LA 24^e ET DE LA 48^e HEURE.

Après la période de multiplication logarithmique, le nombre des germes de la culture s'accroît assez lentement pour qu'il n'y ait pas d'inconvénient à considérer le chiffre fourni par des numérations effectuées sur la culture de 22 heures, et celui donné par la numération correspondant aux germes âgés de 46 heures, comme sensiblement égaux au nombre des microbes existant dans le milieu, respectivement, après 24 et 48 heures d'incubation.

Nous avons donc, dans ces deux cas, effectué des numérations préalables, au moyen du procédé de numération de WRIGHT-FRIES, et les chiffres obtenus nous ont permis de calculer le volume de culture convenablement diluée à prélever pour opérer sur le même nombre de germes que celui mis en expérience au cours des prélèvements antérieurs.

III. — *Marche générale de nos essais.*

1. Choix de la substance antiseptique utilisée.

Nous avons utilisé, comme agent antibiotique, une *solution aqueuse de Lugol à 1 % d'Iode* qui présente les grands avantages de pouvoir être préparée facilement, au moment même de l'essai, d'être stable pour la durée de l'expérience, et, de plus, d'agir, à la concentration choisie, assez rapidement pour les nécessités de la technique utilisée.

La formule de cette solution était la suivante :

Iode.....	1 gr.
Iodure de potassium.....	2 gr.
Eau distillée.....	q. s. p. 100 cm ³

Préparations des dilutions de la substance antiseptique nécessaires aux essais. — Afin de pouvoir déterminer avec une précision suffisante la quantité d'iode nécessaire pour tuer, en un temps donné, les germes d'âges différents provenant d'une même culture en bouillon, nous avons dû établir une série de dilutions antiseptiques de titre croissant, selon une progression très lente. Des essais préliminaires ont tout d'abord été effectués, afin de fixer approximativement les limites de l'échelle des dilutions antiseptiques convenables pour tuer, en 15 *minutes* les germes mis en expérience.

Nous donnons ci-dessous un exemple numérique qui permettra de mieux faire comprendre le calcul servant à déterminer les volumes croissants de la solution d'antiseptique qui étaient mis en contact avec une quantité connue et fixe des germes d'âge différent, de façon à trouver la « dose antibiotique » caractérisant la résistance microbienne à un moment choisi du développement de la culture.

EXEMPLE : Supposons qu'un essai préliminaire nous ait permis de déterminer que, dans nos conditions expérimentales, il suffisait d'ajouter *approximativement* de 0 gr. 50 à

0 gr. 65 d'iode par litre d'une culture de Colibacilles en *bouillon*, ensemencée depuis 2 heures, pour tuer, en 15 *minutes* tous les germes de cette culture. Nous mettrons en expérience des quantités d'iode correspondant par exemple à :

0 gr. 30, 0 gr. 40, 0 gr. 45, 0 gr. 50, 0 gr. 55, 0 gr. 60, 0 gr. 65, 0 gr. 70, 0 gr. 75 et 1 gr. d'iode par litre de bouillon.

2. Matériel des expériences.

Nous préparions, avant chaque essai, outre le matériel habituel servant aux dilutions et aux numérations microscopiques des germes par la méthode WRIGHT-FRIES, des tubes à essai contenant 5 cm³ de bouillon stérile (tubes de subcultures) et des pipettes stériles, graduées en 1/100^e de cm³, pour l'addition de l'antiseptique. Tout ce matériel était stérilisé, soit au four Pasteur pendant 20 minutes à 170°, soit à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°.

3. Germes en expérience.

Les germes en expérience étaient des colibacilles prélevés dans une culture en bouillon simple peptoné, salé, ensemencé à raison de 500.000 germes par centimètre cube, culture effectuée à la température de 37° c.

Les prélèvements étaient effectués dans cette culture après les 2^e, 8^e, 24^e et 48^e heure de l'ensemencement ; dans l'intervalle des prélèvements, le bouillon de culture était maintenu à l'incubation à l'étuve à 37° c.

La préparation de l'émulsion microbienne servant à ensemencer le bouillon était faite dans des conditions rigoureusement identiques à celles que nous avons décrites au cours des chapitres précédents et à partir de la même souche de Colibacille, repiquée sur gélose nutritive inclinée et maintenue à 37° c. Le dénombrement des germes dans cette émulsion était effectué, suivant la technique habituelle, par la méthode WRIGHT-FRIES. La numération terminée, nous introduisions dans un ballon contenant

300 cm³ de bouillon simple stérile, la quantité d'émulsion microbienne titrée nécessaire pour obtenir une culture contenant au départ 500.000 germes par centimètre cube. Comme nous l'avons indiqué plus haut, c'est dans cette culture mère, maintenue à 37° c., que nous avons ensuite prélevé les germes après les 2^e, 8^e, 24^e et 48^e heures d'incubation.

4. Dispositif général d'un essai.

Les quantités de culture à prélever, à chaque période considérée de l'évolution microbienne, étaient déterminées comme nous l'avons vu plus haut (voir p. 114), de façon à expérimenter pendant tout le cours de l'essai sur un même nombre de germes.

Nous avons vu également que les *quantités d'iode* à mettre en contact avec ces germes étaient déterminées, de façon approximative, grâce à des essais préliminaires effectués dans le même milieu de culture, c'est-à-dire en bouillon simple peptoné salé (1).

Le volume total du mélange (culture microbienne + solution d'iode) était *constant* et fixé à 5 cm³. Connaissant, d'une part le volume de la culture microbienne et, d'autre part le volume de la solution d'antiseptique devant être introduits dans chaque tube de la série, il était facile d'établir avant l'essai correspondant à chaque prélèvement, un tableau précisant la quantité de bouillon stérile à ajouter dans chacun de ces tubes pour compléter à 5 cm³ le volume total du mélange.

Chaque série d'essais antibiotiques destinée à étudier la résistance de germes d'un âge donné, était effectuée en mettant en expérience, pour un même volume total de 5 cm³, des quantités d'iode différentes, très rapprochées,

(1) Pour éviter les erreurs introduites par des mesures de volumes trop petits nous avons, dans certains cas, utilisé une dilution à 1/10 de la solution mère de Lugol à 1 %, ce qui nous permettait de mesurer ainsi des volumes 10 fois plus grands.

s'échelonnant de chaque côté de la quantité supposée efficace.

Les tubes de chaque série étaient numérotés de 1 à 10. Un onzième tube servant de témoin contenait 5 cm³ de bouillon stérile et ne recevait ni culture, ni solution d'iode ; enfin, un autre tube témoin contenait du bouillonensemencé, mais pas de solution antiseptique. A l'aide de pipettes stériles on introduisait successivement dans chacun des tubes numérotés :

- a) le volume de culture microbienne apportant la quantité désirée de germes ;
- b) le volume de bouillon stérile nécessaire pour compléter le volume total à 5 cm³ ;
- c) la quantité de solution d'iode que l'on voulait faire agir.

Le tableau donné ci-dessous à titre d'exemple permet de comprendre nettement le dispositif d'un essai :

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Témoins	
											11	12
Volume de culture microbienne en bouillon (en cm ³) :												
	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	0	4,5
Volume de la solution d'iode ajoutée (en cm ³) :												
	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0	0
Volume de bouillon stérile ajouté (en cm ³) :												
	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0	5	0,5

La solution antiseptique était ajoutée en *dernier*, afin d'éviter qu'une partie de l'iode ne fut fixée par les constituants du bouillon avant d'exercer son action sur les germes.

Ayant soigneusement agité le mélange, dans chaque tube, on laissait chacun d'eux au repos pendant 15 *minutes*

exactement, afin de permettre à l'iode d'exercer son action sur les germes. Puis au bout de ce temps, on prélevait dans chaque tube $1/10^e$ de cm^3 du mélange, que l'on reportait dans un tube de subculture contenant 5 cm^3 de bouillon peptoné salé stérile. La série des 10 tubes de subculture était alors placée à l'étuve à 37°C. , afin de permettre le développement des germes qui avaient résisté à l'action antiseptique de l'iode.

Ces tubes de subculture étaient observés chaque jour, jusqu'à ce que le nombre des tubes donnant une subculture positive fût stabilisé. On notait le nombre de tubes de chaque série donnant une subculture positive.

Reprenons l'exemple précédent, et supposons que les tubes de subculture nos 1, 2, 3 et 4 aient présenté un développement positif, alors que les tubes 5, 6, 7, 8, 9 et 10 étaient restés stériles ; ceci signifie que le volume de solution d'iode nécessaire pour tuer en 15 minutes les germes contenus dans les 5 cm^3 du milieu d'essai était supérieur à $0 \text{ cm}^3 20$ et inférieur à $0 \text{ cm}^3 25$.

On aurait donc pu dire que la quantité d'iode nécessaire à tuer les germes était, dans cet exemple :

$$\frac{0,20 + 0,25}{2/100^e}$$

Puisque la solution d'iode utilisée était une solution à 1 %, et, étant donné la définition donnée ci-dessus de la « dose antibiotique », on aurait dit que la dose antibiotique d'iode, dans les conditions de l'essai (c'est-à-dire la dose par litre de milieu d'essai) était :

$$\frac{0,00225 \times 1.000}{5} = 0 \text{ gr. } 45$$

Nous venons de donner le dispositif général d'un essai. Nous allons maintenant décrire successivement les essais effectués en mettant en expérience des germes âgés respectivement de 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures.

a) *Détermination de la « dose antibiotique » de l'iode vis-à-vis des germes de B. Coli âgés de 2 heures.*

Deux heures après avoir ensemencé notre bouillon de culture et l'avoir placé à l'étuve à 37° c., nous sortions la culture de l'étuve et, l'ayant soigneusement agitée, nous y prélevions une série de 10 échantillons de 4 cm³ 5, que nous introduisions dans une série de 10 tubes stériles numérotés, ayant un diamètre suffisamment grand pour permettre une agitation facile et efficace. Nous réalisions ainsi la série des tubes nos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10.

Nous ajoutions ensuite, dans chacun de ces tubes, la quantité de bouillon simple stérile nécessaire pour obtenir, après addition de la solution antiseptique, *un volume total de 5 cm³.*

Le volume de 4 cm³ 5 introduit dans chaque tube de la série numérotée assurait la présence dans le milieu d'essai de 2 millions à 3 millions de germes par centimètre cube du milieu. Ceci fait, nous introduisions dans la série des tubes les quantités préalablement calculées de bouillon stérile destiné à compléter le volume à 5 cm³, puis les quantités croissantes, également déterminées au préalable, de la solution iodo-iodurée, ces quantités étant situées dans la zone des doses supposées efficaces. Après une agitation soigneuse de chaque tube, nous abandonnions la série des tubes pendant 15 *minutes*.

Au bout de ce temps, nous prélevions dans chaque tube 1/10^e de cm³ du mélange, que nous portions dans un tube contenant 5 cm³ de bouillon de « subculture ». La série des tubes de subcultures était portée à l'étuve à 37° c.

Cet essai étant effectué, il s'agissait de connaître le nombre exact de germes mis au contact de l'iode par centimètre cube du milieu d'essai, afin d'adopter ce taux pour tous les essais ultérieurs concernant les germes âgés de 8 heures, 24 heures et 48 heures. Nous avons expliqué plus haut (voir p. 115) la raison pour laquelle le dénombrement des germes ne pouvait être effectué avant l'essai. La numé-

ration était réalisée, comme nous l'avons indiqué, à partir de la culture mère âgée de 2 heures, en suivant notre technique habituelle de WRIGHT-FRIES. Le prélèvement destiné à cette numération était effectué simultanément aux prélèvements destinés aux essais antibiotiques, c'est-à-dire qu'*immédiatement* avant de prélever les 10 échantillons de 4 cm³ 5, on prélevait, dans la culture agitée, 10 cm³, que l'on introduisait dans un tube stérile contenant quelques billes de verre et que l'on plaçait aussitôt à la glacière pour arrêter le développement des germes pendant la durée de l'essai antibiotique. Dès que cet essai était terminé, on procédait à la numération.

b) *Détermination de la « dose antibiotique » de l'iode vis-à-vis de Colibacilles âgés de 8 heures.*

Huit heures après l'ensemencement, une série de 10 échantillons nouveaux étaient prélevés dans la culture. Mais comme nous l'avons noté précédemment, le développement abondant de la culture à ce moment nous obligeait à effectuer une dilution préalable de la culture. Cette dilution était effectuée à 1/100^e, selon les règles habituelles et consistait à introduire 1 cm³ de la culture en bouillon dans 100 cm³ d'eau distillée stérile, contenue dans un ballon muni de billes de verre pour favoriser l'agitation nécessaire à la bonne répartition des germes dans la totalité du volume.

La quantité de dilution à 1/100^e à prélever était de l'ordre de 1 cm³ (1).

(1) Comme nous l'avons indiqué précédemment, en raison de la rapidité de la multiplication microbienne pendant la « phase logarithmique » il nous était impossible d'effectuer une numération préalable du nombre des germes dans la culture. Afin de fixer le taux et le volume de la dilution qui devaient mettre en expérience pour l'essai de la 8^e heure le même nombre de germes que pour l'essai de la 2^e heure, nous nous sommes reportée comme il a été dit plus haut, aux résultats numériques obtenus dans la série des expériences concernant l'évolution du nombre des bactéries, les conditions identiques de culture observées dans les deux séries d'essais permettant de faire le rapprochement sans erreur appréciable.

L'introduction de la quantité nécessaire de culture diluée, du bouillon simple stérile, et des quantités croissantes de solution iodo-iodurée, s'effectuait exactement de la manière indiquée pour le prélèvement de la 2^e heure, ainsi que les opérations ultérieures.

c) *Détermination de la « dose antibiotique » de l'iode vis-à-vis des germes âgés de 24 heures et de 48 heures.*

Les essais effectués pour la détermination de la « dose antibiotique » de l'iode vis-à-vis de germes âgés respectivement de 24 et 48 heures, étaient conduits dans des conditions exactement comparables à celles décrites pour les essais des heures précédentes. Rappelons toutefois que, passé la phase de multiplication logarithmique, l'évolution plus lente du nombre des germes dans la culture nous permettait d'effectuer avant l'essai des numérations par la technique habituelle de WRIGHT-FRIES. Ces numérations à partir de prélèvements de la culture âgée de 22 heures et de 46 heures, nous fixaient sur les volumes de culture diluée à mettre en expérience respectivement dans les essais de 24 et de 48 heures. Ces volumes variaient en général entre 0 cm³ 20 et 0 cm³ 60 d'une dilution 1/100^e de la culture âgée soit de 24 heures, soit de 48 heures. Cette dilution était effectuée au moment de l'essai de la façon déjà indiquée pour l'essai de la 8^e heure.

En dehors des essais préliminaires destinés à nous fixer sur les doses approximatives d'iode à mettre en contact avec les germes aux différentes périodes considérées de l'évolution microbienne, nous avons effectué trois séries d'expériences pour la mesure des « doses antibiotiques » de l'iode vis-à-vis de germes de Colibacille âgés respectivement de 2 heures, 8 heures, 24 heures et 48 heures.

Nous donnons, plus loin, sous forme de tableaux, les résultats obtenus au cours de ces divers essais.

IV. — Résultats numériques. « Dose antibiotique » de l'iode vis-à-vis de germes prélevés à divers stades de leur développement dans une culture en bouillon de B. Coliensemencée à raison de 500.000 germes par centimètres cubes.

EXPÉRIENCE I.

Les germes utilisés pour cette expérience étaient des colibacilles prélevés dans une culture en bouillonensemencée au départ à raison de 500.000 germes par centimètre cube et maintenue à 37° c.

a) *Essai de la 2^e heure.* — Après 2 heures d'incubation de la culture à 37° c., nous prélevions une série de 10 échantillons de 4 cm³ 5, ainsi qu'un échantillon destiné à la numération microbienne. Cette numération effectuée ultérieurement par la méthode WRIGHT-FRIES nous a montré que le nombre des germes mis en expérience à cette période (c'est-à-dire le nombre contenu dans 4 cm³ 5 de la culture mère) était de :

$$3.270.000 \times 4,5 = 14.715.000 \text{ germes.}$$

Tubes ^{no}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Témoin ⁴
Volume de culture en bouillon âgée de 2 heures (en cm ³) :											
	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	0
Volume de la solution d'iode à 1 % (en cm ³) :											
	0,15	0,20	0,225	0,25	0,275	0,30	0,325	0,35	0,375	0,50	0
Volume de bouillon stérile complétant le volume total à 5 cm ³ :											
	0,35	0,30	0,275	0,25	0,225	0,20	0,175	0,15	0,125	0	5
Résultats des subcultures :											
	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	néant

Le calcul nous montre que la « dose antibiotique » cherchée est à cette période de :

$$\frac{(0,30 + 0,325)}{2 \times 100} \text{ pour } 5 \text{ cm}^3 \text{ de milieu, soit :}$$

$$\frac{0,30 + 0,325}{2 \times 100} \times 200 = 0 \text{ gr. } 625 \text{ par litre de milieu.}$$

b) *Prélèvement de la 8^e heure.* — Après 8 heures d'incubation de la culture mère à 37° c., nous en prélevons un échantillon de 1 cm³ à partir duquel était effectuée une dilution au 1/100^e. Nous introduisons dans chaque tube numéroté 1 cm³ de cette dilution correspondant à 14.715.000 germes, c'est-à-dire au même nombre de germes mis en expérience précédemment. Voici le tableau donnant la marche de l'essai à cette période.

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Témoin
Volume d'une dilution 1/100 de la culture mère (en cm ³) :											
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Volume de la solution d'iode à 1 % (en cm ³) :											
	0,20	0,25	0,275	0,30	0,325	0,35	0,375	0,40	0,50	0,75	0
Volume de bouillon stérile complétant le volume total à 5 cm ³ :											
	3,80	3,75	3,725	3,70	3,675	3,65	3,625	3,60	3,50	3,25	5
Résultats des subcultures :											
	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	néant

« La dose antibiotique » à cette période est donc de :

$$\frac{0,325 + 0,35}{2 \times 100} \times 200 = 0 \text{ gr. } 675 \text{ par litre de milieu.}$$

c) *Prélèvement de la 24^e heure.* — La numération WRIGHT-FRIES, effectuée à partir d'un échantillon de la culture pré-

levé dans la période qui précède immédiatement l'heure de l'essai, nous montrait que cette culture contenait 2 milliards 274.800.000 germes par centimètre cube. Pour introduire 14.715.000 germes en expérience, nous devions donc prélever :

$$\frac{1 \times 14.715.000}{2.274.800.000} = 0 \text{ cm}^3 006 \text{ de la culture mère, soit } 0 \text{ cm}^3 6$$

d'une dilution à 1/100^e de cette culture.

Tubes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Témoin
Volume d'une dilution 1/100 de la culture mère (en cm³) :											
	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0
Volume de la solution d'iode à 1 % (en cm³) :											
	0,15	0,20	0,25	0,275	0,30	0,325	0,35	0,375	0,50	0,75	0
Volume de bouillon stérile complétant le volume total à 5 cm³ :											
	4,25	4,20	4,15	4,125	4,10	4,075	4,05	4,025	3,90	3,65	5
Résultats des subcultures :											
	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	néant

La « dose antibiotique » à cette période est donc de :

$$\frac{0,25 + 0,275}{2 \times 100} \times 200 = 0 \text{ gr. } 525 \text{ par litre du milieu.}$$

d) *Prélèvement de la 48^e heure.* — La numération WRIGHT-FRIES effectuée à partir d'un échantillon de la culture prélevé dans la période qui précède immédiatement l'heure de l'essai, nous montrait que cette culture contenait alors 2.257.100.000 germes par centimètre cube. Pour introduire 14.715.000 germes en expérience, nous devions donc prélever :

$$\frac{1 \times 14.715.000}{2.257.100.000} = 0 \text{ cm}^3 006 \text{ de la culture mère, soit,}$$

comme dans l'essai de la 24^e heure, 0 cm³ 6 d'une dilution à 1/100^e de cette culture.

La marche de l'essai de 48^e heure étant en tous points semblable à celle que nous avons suivie pour la 24^e heure et les résultats obtenus étant identiques, nous ne reproduisons pas le tableau précédent qui peut s'appliquer tout aussi bien à ce nouvel essai.

Donc, nous avons de même à la 48^e heure comme « dose antibiotique » :

$$\frac{0,25 + 0,275 \times 200}{2 \times 100} = 0 \text{ gr. } 525 \text{ par litre de milieu.}$$

Nous avons groupé dans le tableau suivant la série des « doses antibiotiques » de l'iode vis-à-vis de germes d'âges différents relevées au cours de cette 1^{re} expérience.

EXPÉRIENCE 1.

Age des germes	2 heures	8 heures	24 heures	48 heures
Dose antibiotique de l'iode exprimée en gr. par litre du milieu de culture	0,625	0,675 (maxim.)	0,525	0,525

Pour l'expérience n° II et l'expérience n° III, nous nous bornerons à reproduire le tableau résumant les résultats obtenus, les conditions expérimentales de ces expériences étant très exactement celles que nous avons suivies au cours de l'expérience I.

EXPÉRIENCE II.

Les germes servant de base à cette expérience sont, comme dans les essais précédents, des colibacilles prélevés dans une culture en bouillon ensemencée à raison de 500.000 germes par centimètre cube et maintenue à 37° c.

La solution d'antiseptique dont nous suivions l'action

antibiotique vis-à-vis des germes traités était une solution d'iode à 1 %.

« DOSES ANTIBIOTIQUES » RELEVÉES AU COURS DE L'EXPÉRIENCE N° 2.

Age des germes	2 heures	8 heures	24 heures	48 heures
Dose antibiotique de l'iode exprimée en gr. par litre du milieu de culture	0,675	1,25 (maxim.)	0,875	0,875

EXPÉRIENCE III.

Réalisée avec des colibacilles appartenant à une culture en bouillon, incubée à 37° c. et ensemencée au départ à raison de 500.000 germes par centimètre cube et avec une solution antiseptique d'iode à 1 %.

« DOSES ANTIBIOTIQUES » RELEVÉES AU COURS DE L'EXPÉRIENCE N° 3.

Age des germes	2 heures	8 heures	24 heures	48 heures
Dose antibiotique de l'iode, exprimée en gr. par litre du milieu de culture	0,725	1,125 (maxim.)	0,875	0,925

Nous allons reproduire ci-dessous, sous forme de tableau, le résumé des résultats obtenus au cours de ces diverses expériences, puis nous passerons à l'interprétation de ces résultats.

Age des germes en expérience	Dose antibiotique d'Iode		
	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3
2 heures	0,625	0,675	0,725
8 heures	0,675 (maximum)	1,25 (maximum)	1,125 (maximum)
24 heures	0,525	0,875	0,875
48 heures	0,525	0,875	0,925

V. — *Interprétation des résultats.*

L'examen des chiffres obtenus dans les expériences précédentes permet les constatations suivantes :

a) La « dose antibiotique » d'iode, c'est-à-dire la quantité d'iode nécessaire pour tuer, en 15 minutes, une quantité connue de Colibacilles (cette quantité de germes était dans nos essais, de l'ordre de 15.000.000 pour 5 cm³ de milieu d'essai, soit de 3 millions par centimètre cube), s'est généralement montrée *moindre* pour les germes âgés de 2 heures que pour les germes plus âgés, cultivés dans les mêmes conditions.

C'est ainsi que les expériences II et III ont donné respectivement comme « doses antibiotiques », pour les germes âgés de 2 heures les valeurs 0 gr. 675 et 0 gr. 725, pour les germes âgés de 8 heures les valeurs 1 gr. 25 et 1 gr. 125, pour les germes âgés de 24 heures les valeurs 0 gr. 875, pour les germes âgés de 48 heures les valeurs 0 gr. 875 et 0 gr. 925.

La résistance des germes à l'action antiseptique de l'iode s'est donc montrée la *plus faible* lorsqu'il s'agissait de germes prélevés à la 2^e heure de leur développement. Ceci ne saurait nous étonner si nous considérons que les microbes se trouvent, à ce moment-là, dans des conditions de vie moins favorables, du fait de leur transport récent dans un nouveau milieu (le bouillon peptoné, salé), auquel ils doivent s'adapter.

b) Dans *tous les cas*, la « dose antibiotique » la *plus forte* a été obtenue alors que l'essai portait sur des germes prélevés à la 8^e heure de leur développement, c'est-à-dire que ce sont les *germes âgés de 8 heures qui se sont montrés les plus résistants à l'action désinfectante*.

Ce fait paraît confirmer nos constatations antérieures au sujet de la variation de la vitalité microbienne au cours du développement de la culture. Les germes âgés de 8 heures présenteraient donc une résistance forte aux antiseptiques, en accord avec la vigueur maxima que nous leur avons constatée en effectuant leur transport sur gélose, transport beaucoup mieux supporté par ces germes qu'il ne l'était par des microbes plus jeunes ou plus âgés.

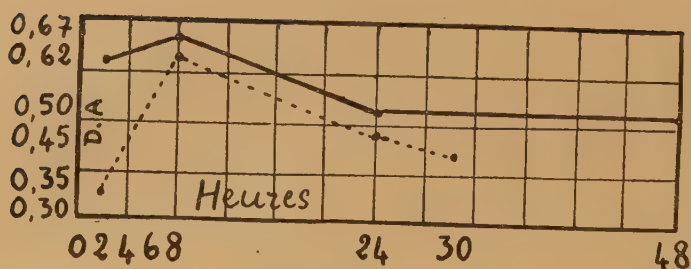
c) Les « doses antibiotiques » de l'iode, déterminées vis-à-vis de germes âgés de 24 heures, d'une part, et de 48 heures, d'autre part, ont toujours présenté des valeurs *sensiblement égales*. Ceci revient à dire, que nous n'avons pas observé de *différence sensible* entre les résistances, à l'action désinfectante, des germes prélevés soit à la 24^e, soit à la 48^e heure de leur développement.

VI. — *Rapprochement des courbes traduisant les variations de résistance des germes à l'action antiseptique de l'iode en fonction de leur âge, et des courbes traduisant les variations du « Rapport de vitalité » des germes au cours de leur développement.*

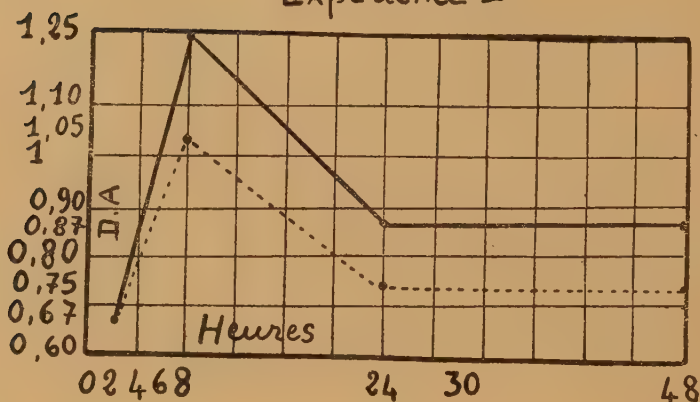
Il était intéressant de rapprocher les résultats traduisant l'influence de l'âge des germes sur leur résistance à l'action antiseptique, de ceux précédemment obtenus, pour les « rapports de vitalité » de germes d'âges différents.

Afin de rendre ce rapprochement plus facile, nous avons établi les courbes représentant les variations des diverses « doses antibiotiques » d'iode pour les germes d'âge différent (courbes p. 134). Ces courbes ont été établies en portant en abscisses l'âge des germes en expérience, et en ordon-

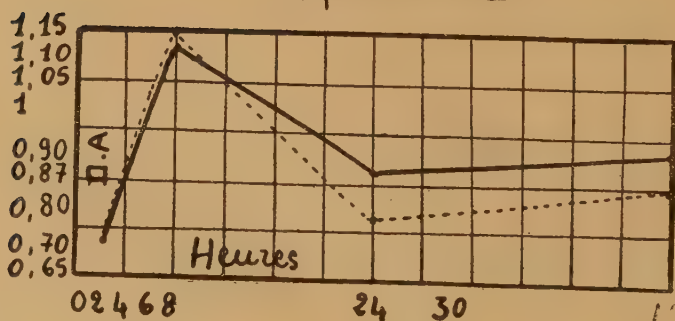
Expérience I



Expérience II



Expérience III



Courbes des variations de la dose antibiotique entre 0 et 48 heures (trait plein).

Courbes des variations correspondantes du « rapport de vitalité » (exp. 7-5-4, trait pointillé).

nées les valeurs des « doses antibiotiques » d'iode correspondantes.

Ces graphiques montrent nettement les variations de la résistance des germes en fonction de leur âge, et permettent de retrouver les faits énumérés plus haut, en particulier *la résistance maxima des germes à la 8^e heure*, qui coïncide avec le sommet de la courbe des variations de vitalité.

Si nous rapprochons les courbes traduisant les variations des « doses antibiotiques » et les courbes précédemment établies traduisant les variations du « rapport de vitalité » du même germe, en fonction de l'âge et dans les mêmes conditions d'expérience, nous constatons les faits suivants :

a) L'étude des variations du « Rapport de vitalité », c'est-à-dire les variations du rapport :

germes « repiquables », c'est-à-dire capables de se reproduire
après transport sur gélose

totalité des germes visibles

en fonction de l'âge des germes prélevés, nous avait conduit à conclure à une *moindre résistance* des germes à la 2^e heure de leur développement.

Ce fait est traduit sur les courbes des variations du « Rapport de vitalité » où nous voyons la courbe des différentes valeurs de ce rapport atteindre, dans toutes les expériences, son *minimum* pour le prélèvement de la 2^e heure.

De même l'étude des variations de la « dose antibiotique » de l'iode en fonction de l'âge des germes prélevés démontre, comme nous l'avons signalé plus haut, *la moindre résistance des germes de 2^e heure*.

b) Le *sommet* des courbes traduisant les variations des valeurs du « Rapport de vitalité » en fonction du développement de la culture, c'est-à-dire la *valeur maxima* de ce « Rapport de vitalité », correspond aux germes âgés de 8 heures.

De même l'étude des variations de résistance du même germe à l'action antibiotique de l'iode nous conduit à conclure à un maximum de résistance à l'action antiseptique, donc à une *vigueur maximum* des germes à cette période de leur développement.

c) Les courbes relatives aux variations du « Rapport de vitalité » accusent une diminution très nette de ce rapport après la 8^e heure de l'ensemencement, c'est-à-dire après la fin de la période logarithmique. La valeur de ce rapport retombe, à la 24^e heure, à un chiffre *voisin* (en général un peu supérieur), du chiffre obtenu pour le « rapport de vitalité » à la 2^e heure. Nous avons conclu à un affaiblissement de la vigueur des germes, après la phase de multiplication logarithmique et ce fait est confirmé par les résultats obtenus dans l'étude des variations de résistance à l'action désinfectante de l'iode, comme le montrent les résultats donnés plus haut.

d) Les germes âgés de 24 et 48 heures semblent avoir sensiblement la même vigueur ; ils se comportent de la même façon vis-à-vis de l'action antiseptique de l'iode.

Pour rendre la comparaison des résultats plus nette, nous avons reproduit côte à côte les courbes de variations de résistance du Colibacille à l'action désinfectante de l'iode, et les courbes des variations du « Rapport de vitalité » du même germe, en supprimant dans ces dernières les points se rapportant aux prélèvements effectués dans le premier cas aux 4^e, 6^e et 30^e heure, et qui ne sont pas communs aux deux séries d'essais.

La similitude parfaite des variations constatées au cours de l'étude de « l'action antibiotique » de l'iode nous conduit à la même conclusion que nous avons déjà faite en rapprochant les variations du nombre des germes dans une culture avec les variations concomitantes de leur taille (voir p. 95).

Ici, encore, en effet, nous arrivons, par l'emploi de procédés différents, à la même notion générale de « vitalité bactérienne » et à la même évaluation des variations de cette

vitalité, en fonction de l'âge des germes en expérience.

Il nous reste donc à rassembler, tout en les résumant, les observations faites au cours de ces divers essais, et à les coordonner de façon à faire ressortir les conclusions que nous croyons pouvoir tirer de ces recherches.

CONCLUSIONS.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de nos essais sur le Colibacille nous a montré que ce germe présente, au cours de son développement, des variations importantes dans sa morphologie, dans sa faculté reproductrice et dans sa résistance à l'action antiseptique de l'iode.

Les rapprochements effectués entre les diverses séries d'essais destinés à étudier chaque groupe de variations nous ont permis de mettre en évidence les faits suivants :

a) La numération des germes âgés de 2 heures par la méthode de numération WRIGHT-FRIES accuse une multiplication sensible de ces germes pendant la période dite « de latence », ce qui confirme les résultats précédemment obtenus, par J. RÉGNIER et ses collaborateurs, sur le B. Pyocyanique.

D'autre part, la faible valeur du « rapport de vitalité »

$$\frac{(\text{germes repiquables})}{\text{totalité des germes visibles)}$$

et la moindre résistance à l'action antibiotique de l'iode, des germes à cette période, montrent que ces germes, s'ils conservent la faculté de se multiplier, sont devenus extrêmement fragiles.

b) Les cultures âgées de 8 heures montrent une prédominance très marquée des formes *courtes* et *grasses* fixant le colorant de façon intense. Ces germes présentent alors un maximum de *vigueur reproductrice* comme en témoigne la valeur très forte des « Rapports de vitalité » qui leur cor-

respondent, et un *maximum de résistance* à l'action antibiotique de l'iode.

c) Nous avons pu constater l'existence des formes longues du Colibacille, signalées par de nombreux auteurs qui tendent à leur attribuer une importance particulière. Elles ont été rencontrées dans les cultures, à tous les stades de leur développement, mais toujours en nombre très limité. Ceci ne nous permet pas de leur accorder une influence prépondérante, dans l'évolution de la culture.

d) Si l'on considère l'ensemble des variations observées au cours de nos essais, soit dans la morphologie, soit dans la valeur de poussée, soit dans la résistance à l'action antibiotique de l'iode, on peut en conclure que la vitalité générale du *B. Coli* croît rapidement de la 2^e à la 8^e heure qui suit l'ensemencement, puis diminue jusqu'à la 24^e heure pour se maintenir sensiblement égale jusqu'à la 48^e heure.

Vu : le Président de la thèse,
RADAIS.

Vu : le Doyen,
PAUL GUÉRIN.

Vu et permis d'imprimer :
le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALMQUIST (E.). — Studien über das Verhalten einiger pathogenen Mikroorganismen bei niedriger Temperatur. *Cent. f. Bakt.*, 1908, I. Or. **48**, 175.
 - Studien über filtrierbare Formen in Typhuskulturen. *Cent. f. Bakt.*, 1911, I. Or. **60**, 167.
 - Wuchsformen, Fruktifikation, und Variationen der Typhusbakterie. *Ztsch. f. Hyg.*, 1917, **83**, 1.
 - Variation and life cycles of pathogenic bacteria. *Journ. Inf. Dis.*, 1922, **31**, 483 ; Investigations on bacterial hybrids, 1924, **35**, 341.
 - Biologische Forschungen über die Bakterien. Stockholm, 1925, P. A. Norstedtsoner.
2. BAIL (Oscar). — Bakterienkultur als Hilfsmittel experimenteller Populationsforschung. *Arch. f. Hyg.*, 1929, **102**, 71.
3. BARBER (M. A.). — The rate of multiplication of *Bacillus Coli* at different temperatures. *Journ. Inf. Dis.*, 1908, **5**, 379.
4. BARUCH (L.). — Untersuchen über die Lange einiger Bakterienarter mit Berücksichtigung der Kollektivmasslehre. Inaug. Dissert. Königsberg, 1916. *Cent. f. Bakt.*, I, Ref. **66**, 261.
5. BAYNE-JONES (S.) et ADOLPH (E. F.). — Symposium on Bacterial dissociation and Life cycles. I. Phases of growth in size of Bacilli and yeast Measured from motion-pictures. *Journ. Bact.*, 1932, **23** ; *Journ. Cell. and Comp. Physiol.*, 1932, **2**, 329.
6. BAYNE-JONES (S.) et SANDHOLZER (L. A.). — *Journ. Exp. Med.*, 1933, **57**, 279.
7. BEMANS (T. H. C.). — Relief staining for bacteria and spirochaets. *Brit. med. Journ.*, 1916, **2**, 722.
8. BERGSTRAND (H.). — Über sogenannte Corynebakterien und

- ihre Verwandten, nebst Bemerkungen über Bakterien im Allgemeinen. *Acta medica Scandinavia*, 1919, **52**, 1.
- On the structure of bacteria. *Id.*, 1921, d° **55**, 529.
- Further studies on the morphology of bacteria. *Journ. bact.*, 1923, **8**, 365.
9. BILLROTH. — Untersuchungen über die Vegetationsformen der *Cocobacteria septica*. Berlin, 1874.
- 9 bis. BREED (R.) et BREW (J.). — Counting bacteria by means of the microscope. *Technical bulletin*, n° 49. New-York. *Agricult. Exper. Station.*, 1916, 1-31.
10. BÜCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Über die Vermehrungsgeschwindigkeit der Bakterien. *Cent. f. Bakt. und Par.*, 1887, **2**, 1, 6.
11. BURRI. — Das Tuscheverfahren, Iena, 1909.
12. CHESNEY (Alan M.). — The latent period in the growth of bacteria. *Journ. of experim. Med.*, 1916, **24**, 387.
13. CHICK (Miss H.). — The bactericidal properties of blood serum. *Journ. of Hyg.*, 1912, **12**, 444.
14. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1919, **4**, 615.
- 14 bis. COHEN (Barnett) et CLARK (Mansfield). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. of Bact.*, 1919, **4**, 409.
15. COHN. — Beiträge zur Biol. der Pflanzen. Breslau, 1875.
16. DAVID (R.). — Contribution à l'étude de la multiplication du Bacille Pyocyane dans différents milieux de cultures liquides. Influence de la teneur en certains éléments nutritifs. Th. Doct. ès sc. Paris, 1931, Durand, Chartres, éd.
17. EIJKMAN (C.). — Über thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstums hemmung der Mikroorganismen. *Cent. f. Bakt. und Par. Or.* 1904, **37**, 436.
18. ENDERLEIN (G.). — Bakterien Cyclogenic, Berlin und Leipzig, w. de Gruyteretlo, 1925, 390.
19. FABRY (Paul). — Les réactions d'immunité vis-à-vis d'une nouvelle race artificielle de *B. Coli*. *Ann. I. P.*, 1922, **36**, 654.
20. FISCHER. — Yahub. d. Win. Bot., **27**, 152. Vorbesungen über Bakterien, Iena, 1903 (d'après GOTSCHLICH).
21. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der

- Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Cent. f. Bakt., Or.*, 1924, **86**, 90.
22. FUHRMANN (F.). — Entwicklungszyklen bei Bakterien. *Beihfte z. Botan. Cent.*, 1908, **23** (Abt. I).
- Einführung in die Grundlagen der technischen-Mykologie. *Zweite Auflage*. Gustav Fischer, Iena, 1926, 55, 59.
23. GOTSCHLICH (E.). — Die Variabilität der Mikroorganismen in allgemeinbiologischer Hinsicht. C. r. de la 10^e réunion de l'Association allemande de microbiologie du 12 au 14 juin 1924 à Göttingen. *Cent. f. Bakt., I. Abt. Or.*, 1924, **93**, 1.
24. GUIGNARD (L.) et CHARRIN (A.). — Sur les variations morphologiques des microbes. *C. r. Ac. Sc.*, 1889, **105**, 1192.
25. GUIGNARD (L.). — Notions générales sur les Bactéries, 1895. G. Masson, Paris, éd.
26. HAUSAM (Willi). — Untersuchungen über *Bakterium Coli*. *Cent. f. Bakt.*, 1931, **2**, 82.
27. HEHEWERTH (F. H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. KLEIN, und einige Anwendungen derselben. *Arch. f. Hyg.*, 1901, **39**, 321.
- 27 bis. HENRI (M^{me} Victor). — Etude sur l'action métabiotique des rayons ultra-violets. Modifications morphologiques et biochimiques de la Bactéridie charbonneuse. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, **159**, 340.
28. HENRICI (A. T.). — Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, **20**, 293.
- A statistical study of the form and growth of *Bacterium Coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, **21**, 215.
- Influence of age of parent culture on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, **21**, 343.
- Influence of concentration of nutrients on size of cells of *Bacillus megatherium*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, **21**, 345.
- Morphologic variations and the rate of growth of bacteria, 1928, 1 vol., 194 p. Baillière, Tindall et Cox, London.
- 28 bis. HOLLANDE (A. Ch.) et M^{me} HOLLANDE. — Cytologie du Colibacille. *G. R. Ac. Sc.*, **193**, 1353, 1931.

29. HORT. — Morphologic studies in the life histories of bacteria. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, Ser. B, 1917, **89**, 468.
30. JANKE et HOLZER. — Die Anwendung variationsstatistischer Methoden auf die Mikrobenmessung. *Cent. f. Bakt.*, II, 1928, **74**, 26.
31. JENSEN (K. A.). — Durch direkte mikroskopische Beobachtung ausgeführte Untersuchungen über das wachstum des *Coli-Bazillus*. *Cent. f. Bakt.*, I, Or., 1928, **107**.
32. KAPLAN (A.). — Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. Th. Doct. Univ. Paris, 1931. Vieillemand, Paris, éd.
33. KLEBS. — *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, I, 1873.
34. KLEIN (Alex.). — Eine einfache Methode zur Sporenfärbung. *Cent. f. Bakt. und Par.*, 1899, **25**, 376.
 — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Cent. f. Bakt. und Par.*, 1900, **27**, 834.
 — Über die Dosierung der Schutzimpfstoffe. *Berlin. Klin. Wochenschrift*, 10 avril 1916, 395-399.
35. KUFFERATH. — Sur la forme et la culture du *B. Coli* sur gélose minéralisée et lactosée. *C. R. Soc. Biol.*, **85**, 16, 1921.
- 35 bis. LAMBIN (S.). — Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques. Th. Doct. ès Sc. Paris, 1933, Masson, éd.
36. LANE CLAYTON (Janet E.). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions thereon. *Journ. Hyg.*, 1919, **9**, 239.
37. LÖHNIS (F.). — Studies upon the life cycles of bacteria. *Mémoires Nat. Ac. Sc.*, 1921, **16**.
38. LÖHNIS (F.) et SMITH. — Life cycles of the Bacteria. *Journ. Agr. Res.*, 1916, **6**, 675.
39. MARCHAL (J. G.). — Variation et mutation en Bactériologie. *Th. Sc.*, Paris, 1932,
- 39 bis. MARTIN (D. S.). — *Journ. Gen. Physiol.*, 1932, **15**, 691.
40. MASSINI. — *Arch. f. Hyg.*, **61**, f. 3, 250.
41. MASSON. — Essai sur l'adaptation des bactéries aux antiseptiques. *Th. Doct. Univers.* Paris, 1910.
42. MELLON (R. R.). — The life cycle changes of the so-called *B. Hodgkin* and their relation to mutation changes in this species. *Journ. Med. Res.*, 1920, **42**, 61.

- Studies in microbic heredity. I. Observations on a primitive form of sexuality (zygospore) in the colon typhoid group. *Journ. Bact.*, 1925, **10**, 481. II. The sexual cycle of *B. Coli* in relation to the origin of variants with special reference to NEISSER and MASSINI's *B. Coli mutabile*. *Id.*, 1925, **10**, 579. III. The hereditary origin of group and specific agglutinogens among the Colon-alkaligenes organisms. *Journ. immunol.*, 1926, **11**, 139.
43. MENOUX. — Considérations générales sur la forme chez les bactéries. *Travaux du Lab. de Microbiol. de la Fac. de Pharm. de Nancy*, 1927.
44. METCHNIKOFF (E.). — Atténuation des bactéries charbonneuses. *Ann. Inst. Past.*, 1887, **1**, 42. L'Immunité. Paris, 1901, Masson, éd. *Ann. Inst. Past.*, 1895, **9**, 433.
45. MIQUEL. — Instructions relatives à l'analyse micrographique des eaux. *Rev. d'Hyg.*, 1887, **9**, 725.
— Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux, 1891. Paris, Gauthier-Villars, éd.
46. MÜLLER (Max). — Über den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus-Bacillus. *Ztschr. f. Hyg.*, 1895, **20**, 245.
47. NAEGELI et SCHWENDENER. — Das Mikroskop. *Zweite Aufl.*, 1877, 640.
48. NEISSER (Max). — Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. *Ztschr. f. Hyg.*, 1895, **20**, 118.
49. ORSKOV (J.). — Method for the isolation of bacteria in pure culture from single cells and procedure for the direct tracing of bacterial growth on a solid medium. *Journ. of Bact.*, 1922, **7**, 537.
- 49 bis. PEARL (R.). — The biology of population growth. N. Y., 1925.
50. PÉJU et RAJAT. — Le Colibacille dans les milieux salins. *C. R. Soc. Biol.*, **60**, 468, 494, 628, 1906.
51. PENFOLD (W. J.) et NORRIS (D.). — The relation of concentration of food Supply to the generation time of Bacteria. *Journ. Hyg.*, 1912, **12**, 527.
52. PIJPER (A.). — Méthode de mesure des bactéries. Over differentieele filtratie. *C. R. Roy. Sc. d'Amsterdam*, 1929, **36**, n° 10 ; *B. I. P.*, **27**, 206.

53. PISU (I.). — Variations muqueuses et rugueuses du *B. Coli* dans une eau carnienne. *Bull. Soc. di Microbiologia*, 1934.
54. PROUST. — *Rev. d'Hygiène et de Police sanitaire*, 1884 (d'après NEISSER).
55. RAHN (Otto). — Über den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. *Cent. f. Bakt. und Par.*, II Abt, 1906, **16**, 417, 609.
56. REED (H. S.) et REYNOLDS (R. R.). — *Techn. Bull.*, 10, Va. Agric. Exper. Sta., 1916.
57. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Etude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharm.*, 1927, **34**, 401 et 490.
- 57 bis. — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Dénombrement des colonies développées sur milieux nutritifs solidifiés. *Bull. Sc. Pharm.*, 1934, **XLI**, 7-78.
58. RÉGNIER (J.) et NEIPP (L.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Numération de la totalité des microbes visibles. *Bull. Sc. Pharm.*, 1934, **XLI**, 152, 231, 291.
59. ROLIN (M.). — La forme des Bactéries. Influence de quelques facteurs physico-chimiques sur leur morphologie. *Thèse Pharmacie*, Nancy, 1929.
- 59 bis. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — Physiological youth in bacteria. *Journ. Bact.*, 1923, **8**, 127.
- The function of lag in bacterial cultures. *Journ. Bact.*, 1924, **9**, 303.
60. SMITH (Graham). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Journ. Hyg.*, 1920, **19**, 133.
61. STAPP et ZYCHA (H.). — Morphologische Untersuchungen an *Bacillus mycoïdes*; ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. *Arch. f. Mikrobiol.*, 1931, **2**, 493.
62. TROTZKY (J.). — Die Grösse der Typhusbacillen, unter Anwendung der Kollektivmasslehre bestimmt. *Cent. Bakt.*, 1913. I. Or. **72**, 113.
63. TROTZKY (W. L.). — Untersuchungen über die Länge der Bakterien. I. Die Bakterienlänge ein individuelles Merkmal jedes Stammes. *Cent. f. Bakt.*, 1929, **112**, 266.

64. VRIES (DE). — Die Mutationslehre, 1902.
65. WALKER (M. M.), WINSLOW (C. E. A.) et MOONEY (G. M.).
— *Journ. Gen. Physiol.*, 1934, 17, 349.
66. WILSON (G. S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. Bact.*, 1922, 7, 405.
67. WRIGHT (A. E.). — *The Lancet*, 1902, 2, 11. London. Technique of the Test and Capillary glass tube, 1912. London, Constable and Co.
68. ZOPF. — Zur Morphologie der Spaltpflanzen, 1883, Breslau.
-

